

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Aislamiento y determinación de estructura química de principios activos presentes en *Eugenia uniflora*, centrado en los compuestos solubles en metanol.



TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL TITULO DE
MAGISTER EN PLANTAS MEDICINALES

Farmacéutica: María Elena del Valle.

Director: Prof. Dr. Luis Bruno Blanch.

Co directora: Prof. Dra. Silvia L. Debenedetti.

Lugar de trabajo: Cátedra de Química Medicinal-
Cátedra de Farmacognosia

Agradecimientos

- A la Universidad de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, que permitieron la realización de este trabajo.
- Al Prof. Dr. Luis Bruno Blanch por su dirección en esta investigación, y generosidad en brindarme el uso de su laboratorio y sobre todo por su tiempo.
- A la Prof. Dra. Silvia L. Debenedetti por su colaboración, consejos y compartir sus conocimientos, desinteresadamente.
- Al Prof. Dr. Aníbal Amat por enviar el material vegetal y realizar la determinación taxonómica.
- A mi colega Farm. Viviana Bravi, con quien compartí los primeros pasos de búsqueda bibliográfica y extracción de *Eugenia uniflora*.
- A mi colega Farm. Josefina Domínguez Cabrera, por compartir parte del ensayo farmacológico.
- A mi colega Farm. Mary Rosella por escucharme y dialogar conmigo, siempre bien dispuesta.
- A mi colega Farm. Alan Talevi por su rapidez para contestar mis preguntas sobre inteligencia virtual.
- A cada una de las personas que constituyen la cátedra de Química medicinal, por la colaboración presentada, creando un ambiente agradable para trabajar.

Y agradezco muy especialmente

- A Dios por todo.
- A mi madre Elena Caporicci (q, e. p. d.) por su aliento y compañía, por sus consejos para toda la vida.
- A mi padre René del Valle López por su esfuerzo para mi formación, por su estímulo constante.
- A mis hijos por haberme acompañado y brindado apoyo incondicional durante la elaboración de esta tesis.



Eugenia Uniflora

ÍNDICE

1. Introducción.....	7
1.1. Búsqueda en la historia del hombre de nuevos principios activos para controlar epilepsia en la flora de nuestro país.....	14
1.2. La epilepsia con el paso del tiempo.....	16
1.3. Mecanismos que posibles que intervienen en el desarrollo de la crisis epiléptica.....	24
1.4. Tratamiento médico.....	25
1.5. Antecedentes de plantas utilizadas como anti-convulsivas.....	27
1.6. Compuestos aislados de plantas con actividad anti-convulsiva...	39
2. <i>Eugenia uniflora</i>.....	41
2.1. Nombres de <i>Eugenia uniflora</i>	41
2.2. Clasificación taxonómica.....	43
2.3. Descripción de la planta.....	44
2.3.1. Toxicidad.....	45
2.3.2. Otros usos populares.....	46
2.4. Farmacogeografía.....	47
2.5. Usos etnofarmacológicos.....	49
2.6. Antecedentes farmacológicos.....	50
2.7. Antecedentes fitoquímicos.....	54
2.8. Selección de la especie.....	61
3-Obtención de Medicamentos a partir de una planta.....	62

4-Ensayos farmacológicos.....	63
4.1. Evaluación de la actividad anticonvulsiva.....	64
5. Objetivo.....	66
6. Materiales y métodos.....	67
6.1. Material vegetal: Procedencia.....	67
6.1.2. Determinación taxonómica.....	67
6.1.3. Procesamiento.....	67
6.2. Extracción del material vegetal.....	67
6.2.1. Obtención del extracto metanólico y hexánico.....	67
6.2.2. Obtención de infusión y cocimiento.....	68
6.3. Análisis Fitoquímico.....	69
6.3.1. Métodos cromatográficos utilizados.....	69
6.3.2. Técnicas de revelado.....	70
6.3.3. Reactivos utilizados.....	71
6.3.4. Fraccionamiento del extracto metanólico.....	73
6.3.5. Reacciones de caracterización.....	74
6.3.6. Cromatografía en capa fina.....	76
6.3.7. Cromatografía en columna FII A.....	77
6.3.8. Cromatografía descendente en papel.....	78
6.3.9. Cromatografía en columna con celulosa.....	78
6.3.10. Cromatografía gaseosa-Espectrometría de masa.....	80
6.3.10.1. Análisis del precipitado P.....	80
6.3.10.2. Análisis de la fracción S.....	81
6.3.11. Cromatografía líquida de alta resolución.....	82
7. Actividad biológica.....	83
7.1. Materiales y métodos.....	83
7.2. Evaluación de la actividad anticonvulsiva en <i>Eugenia uniflora</i>	84
7.2.1. Inducción química de la convulsión.....	84
7.2.2. Inducción física de la convulsión.....	84
7.2.3. Neurotoxicidad.....	85
7.3. Evaluación en sistema nervioso central.....	86
8. Resultados.....	87

8.1. Estudio fitoquímico.....	87
8.1.1. Cromatografía analítica en capa fina.....	87
8.1.1.1. Reacciones de caracterización.....	89
8.1.2. Cromatografía descendente en papel.....	89
8.1.3. Cromatografía en columna de celulosa.....	89
8.1.3.1. Reacciones de caracterización de polifenoles-Flavonoides.....	89
8.1.3.2. Reacciones de caracterización de alcaloides.....	90
8.1.4. Cromatografía en capa fina. (Controles cromatográficos).....	90
8.1.5. Análisis del sobrenadante S de la Fracción F 9-15. por CG-EM	93
8.1.5.1. Compuestos identificados.....	95
8.1.5.1.1. Ácido Shiquímico.....	95
8.1.5.1.2. Ácido Gálico.....	99
8.1.6. Análisis del sobrenadante S por HPLC-DAD.....	102
8.1.6.1. Compuesto identificado: Ácido Clorogénico.....	102
8.1.7. Análisis del precipitado P de la Fracción 9-15 por CG-MS	104
8.1.7.1. Análisis de la fracción 8.....	104
8.1.7.2. Compuesto identificado: N-butil Carbamato de etilo.....	104
8.1.7.3. Análisis de la fracción 1.....	109
8.2. Resultados de la actividad anticonvulsiva.....	112
8.2.1. Fase I de identificación anticonvulsiva.....	113
8.2.2. Fase II de cuantificación anticonvulsiva.....	114
8.2.3. Evaluación comparativa de la protección efectuada por los distintos extractos.....	115
8.3. Resultados de Ensayo global de campo abierto (OPEN FIELD).....	116
9. Discusión	118
10. Conclusiones	121
11. Bibliografía	122
12. Resumen	131
13. Presentaciones a Congresos y Jornadas	133

1. Introducción

La investigación en plantas medicinales se presenta como un desafío para aquellos que trabajan en ella, buscando en la naturaleza nuevas fuentes de principios activos a ser utilizados en terapéutica.

Las plantas medicinales, son definidas por la Organización Mundial de Salud (OMS) como “toda especie vegetal en la que el todo o una parte está dotada de actividad farmacológica” muchos de los principios activos de ellas son usados actualmente como precursores en la semisíntesis químico-farmacéutica. (Villar del Fresno, A. Ed. (1999)

Remontándonos un poco en la historia, se puede decir que desde el comienzo de la vida sobre la tierra, fueron los vegetales en una primera instancia, los que facilitaron la vida de los animales y de los hombres. En un principio, hombres de distintas tribus o comunidades descubrieron casi simultáneamente, plantas cuyo efecto causaba beneficios sobre el comportamiento de los animales y el hombre mismo, algunas eran buenas como alimento, mientras que otras tenían propiedades curativas o tóxicas, Estos fueron los primeros pasos de la metodología de prueba y error, donde el hombre primitivo adquirió mediante ella el conocimiento sobre las especies vegetales que podrían ser útiles en terapéutica.

A pesar de los siglos transcurridos, aun hoy, parte de la población, particularmente los países en desarrollo, no tienen a su alcance la posibilidad de adquirir medicamentos y cuidan su salud primaria recurriendo al uso de plantas, información transmitida debido a su tradición cultural, y cuya eficacia se encuentra avalada por el uso popular.

En este sentido, en el año 2000 la Dra. Zhang directora del Programa de Medicina Tradicional de la OMS, ha realizado

declaraciones, según las cuales “el uso de las plantas medicinales está asumiendo una importancia creciente en la atención primaria de la salud de los individuos y de las comunidades, tanto en los países en vías de desarrollo como en la mayoría de los países desarrollados, existiendo paralelamente un incremento del comercio internacional de estas plantas” (Navarro Moll., (2000).

Debido a lo anteriormente dicho la OMS, pide a su Director general:

“...se asegure que la contribución de los métodos científicamente probados de la medicina tradicional, sean debidamente promocionados en todos los programas de la OMS, especialmente en los que los productos derivados de las plantas u otras sustancias naturales que puedan contribuir al descubrimiento de nuevas sustancias terapéuticas... pedir a los organismos gubernamentales y no gubernamentales, así como a la industria, que promuevan su financiación e implementen esta resolución”. (Navarro Moll., (2000).

Es aquí donde se presenta el desafío de comprobar su eficacia a través de ensayos farmacológicos, y aislar los principios activos responsables de su actividad, identificar sus estructuras y su actividad terapéutica, determinar dosis efectiva, dosis tóxica, y demás pasos que permitan la obtención de un medicamento de calidad, efectivo y seguro. El estudio mediante el cual se llega a obtener un principio activo para la elaboración de un medicamento a partir de una planta medicinal requiere mucho tiempo de investigaciones interdisciplinarias donde los especialistas de cada tema, aportan para su desarrollo entre los que se destacan:

- Etnofarmacobotánicos grupo constituidos por antropólogos usando los mismos códigos de lenguaje, logran información

sobre especies vegetales usadas por poblaciones autóctonas, que interese su estudio para un posterior uso medicinal.

- Botánicos que realizan un reconocimiento del vegetal clasificándolo taxonómicamente y realizando una descripción macro y microscópica, utilizando técnicas cuali y cuantitativas, aportando técnicas histoquímicas de coloración que darán las informaciones primarias sobre la planta en estudio.
- Agrónomos encargados de determinar el momento de recolección apropiado del material vegetal de acuerdo al órgano a estudiar (Ej. Raíces, en otoño, cuando la concentración de principios activos sea mayor). Cuidando de realizar la misma sin afectar su conservación, evitando la extinción de la especie. Posteriormente serán los encargados del cultivo extensivo para su comercialización.
- Farmacognóstas que acondicionarán el material vegetal, lo someterán a procesos de extracción, aislamiento y purificación de los compuestos presentes. Verificarán la pureza de los productos obtenidos y determinarán su estructura química, utilizando los métodos de análisis fisicoquímicos apropiados (U.V., IR. RMN. Espectrometría de Masa etc.).
- Farmacólogos que realizan la evaluación de la actividad biológica, seleccionando los modelos experimentales y las rutas de administración. En una primera etapa, se evalúa la droga vegetal, según el procedimiento utilizado en la medicina folclórica, luego se ensayan los extractos y posteriormente las distintas fracciones, hasta llegar al principio activo aislado y purificado. Este en una posterior evaluación permite obtener por análisis estadístico de los resultados, dosis efectiva y dosis tóxicas. Estudios clínicos posteriores permiten verificar o comprobar la/s acción/es de esta nueva entidad química, etapas necesarias para lograr

un buen medicamento.

Químicos orgánicos de productos naturales que realizaran la síntesis o semisíntesis del principio con actividad terapéutica, con el objeto de confirmar la estructura y plantear métodos de obtención. Muchas veces a partir de modificaciones estructurales, utilizando los modelos o prototipos “cabeza de serie” por medio del diseño molecular puede llegarse a compuestos más eficaces y con menos efectos indeseables, tales como penicilinas, statinas, etc. , Deben tenerse en cuenta otras áreas del conocimiento que contribuyen a este tipo de desarrollo tales como la informática (inteligencia artificial) y la biología molecular que permite comprender el metabolismo, la toxicidad y estructura de los receptores. Este conocimiento permite relacionar la estructura química del ligando y la interacción con el sitio activo.

Se puede decir que: En el conocimiento y la investigación de plantas medicinales es necesario el trabajo conjunto de distintos especialistas, profesionales, con un objetivo en común, **descubrir nuevos principios activos para ser utilizados en terapéutica**, avalando o no el uso popular de muchas de ellas y encontrando nuevas drogas con mayor actividad específica y menos efectos adversos.

Una tercera parte de los medicamentos que se utilizan actualmente derivan de plantas medicinales. Numerosos principios activos fueron aislados a partir de extractos de plantas medicinales, presentando la ventaja de ser puros y homogéneos en cuanto a su composición química habiéndose eliminado los compuestos con actividad o no que los acompañaban, facilitándose el control de calidad.



(Foto de Aspirina Polvo, comprimido y obtención (estructura química) de Hugo Kubinyi Drug Discovery University of Heidelberg Germany)

En la antigüedad chinos, egipcios, griegos y romanos utilizaron la corteza de sauce para aliviar dolores. En el Siglo IV AC Hipócrates, el Padre de la Medicina, trató los dolores con un brebaje de hojas de sauce, posteriormente en 1763 el Dr. Edward Stone presenta el primer trabajo científico sobre el extracto de sauce ante la Sociedad Científica de Londres. En 1828 Andreas Bruchner, de la Universidad de Munich, identifica como salicina el compuesto curativo del sauce. En 1897 el químico de Bayer, Dr. Felix Hoffmann prepara el ácido acetilsalicílico a partir de la salicina. Y así llegamos a que hoy en día el Libro Guinness de los Records certifica que Aspirina® es el analgésico más consumido en el mundo La FDA certifica las acciones cardioprotectoras específicas de

Aspirina. Se publican 3.500 estudios médicos de promedio cada año, que confirman las acciones clásicas de Aspirina y se descubren nuevas potencialidades terapéuticas. La OMS (Organización Mundial de la Salud) clasifica a Aspirina como "medicamento esencial". (OMS, 2003)

Otros ejemplos de drogas de gran uso en farmacia son:

Morfina y Codeína de *Papaver somniferum*,

Emetina de *Cephaelis ipecacuanha*,

Atropina de *Atropa belladonna*,

Colchicina de *Cochicum autumnale*,

Pilocarpina de *Pilocarpus jaborandi*,

Reserpina de *Rawolphia serpentina*.

Digoxina y Digitoxina de *Digitalis purpurea* L.y *D. lanata* Ehrhart, utilizados como carditónicos.

Capsaicina de *Capsicum* spp. Utilizado como anestésico tópico.

Fisostigmina de *Physostigma venenosum* Balf. Utilizado como antiglaucomatoso

L- DOPA de *Vicia faba* utilizada como antiparkinsoniano.

Existen muchos fármacos que son obtenidos a partir de materias primas vegetales tal como se encuentran en ellas, debido a la dificultad de sintetizar dichas moléculas, ya que presentan alta complejidad estructural, y particularmente por su estereoquímica, como es el caso de artemisinina de *Artemisia annua*.

En otros casos en que el procedimiento de obtención es costoso en materia prima y tiempo, se recurre a la semisíntesis, procedimiento que permite usar un precursor y luego hacer las modificaciones necesarias para llegar a la estructura molecular activa. Un ejemplo clásico de lo

planteado, es el Taxol, que es un diterpeno nitrogenado, eficaz antineoplásico aislado inicialmente de *Taxus brevifolia* Nutt. Su síntesis llevó años, se logró acortar el tiempo de obtención utilizando las hojas de *Taxus* spp. , En lugar de la corteza que inutilizaba la planta completa aislando la 10-deacetil baccatina y realizando semisíntesis a partir de esta prodroga que permitió la obtención de un derivado análogo, el docetaxel. (Zaragozá, F. 2003)

Otros ejemplos de principios activos obtenidos de plantas utilizados en la semisíntesis de fármacos son:

Diosgenina a partir de *Dioscorea* spp. Se obtienen hormonas esteroidales.

Podofilotoxina a partir de *Podophyllum* spp. Se obtienen Etopósido y Tenipósido

Estigmasterol a partir de *Glycine max* L. Se obtienen hormonas esteroidales.

Escopolamina a partir de *Datura* spp. Se obtiene n-butilescopolamina.

Como se puede apreciar existen numerosos ejemplos de gran importancia terapéutica.

1.1. Búsqueda de nuevos principios activos para epilepsia

La epilepsia es un grupo heterogéneo de desordenes neurológicos que afecta al 3% de la población mundial. El 30% de los pacientes epilépticos no consigue controlar sus convulsiones con los fármacos antiepilépticos (Anti Epileptic Drugs AEDs) disponibles. Existe por lo tanto la necesidad de buscar nuevas AEDs que sean más eficaces y posean menor toxicidad, siendo los productos naturales una alternativa válida como fuente de nuevas estructuras.

El presente trabajo aborda estudios de plantas medicinales con actividad antiepiléptica, se enfoca teniendo en cuenta la realidad sudamericana, dado que se estima que en nuestro país y en la región existe un porcentaje mayor de enfermos con respecto a los niveles mundiales, según OMS, por ejemplo en Buenos Aires unas 500 mil personas padecen la enfermedad.

Las drogas antiepilépticas en uso presentan gran cantidad de efectos adversos como hepatotoxicidad, teratogénesis, pérdida del vocabulario y somnolencia entre otros, por este motivo se hace necesario intensificar la búsqueda de nuevos principios activos que brinden a los pacientes epilépticos una mejor opción que la actual. (García 2006)

La epilepsia es una afección neurológica, que se presenta como un trastorno provocado por el aumento de la actividad eléctrica de las neuronas en alguna zona del cerebro. Este incremento de la actividad eléctrica de las neuronas se manifiesta en la persona, como una serie de convulsiones o movimientos incontrolados en forma repetitiva, a los que se conoce como crisis. La crisis epiléptica es un síntoma cuyo origen puede deberse a defectos genéticos, drogas tóxicas o

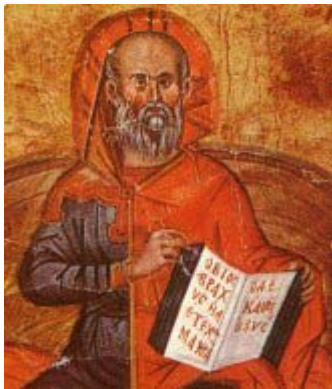
traumatismos cerebrales, muchos pacientes pueden presentar convulsiones sin tener lesiones cerebrales. Históricamente las civilizaciones se han preocupado por encontrar un tratamiento para este tipo de desordenes del sistema nervioso central.

Sin embargo para que una persona sea considerada epiléptica, debe manifestar estas crisis más de dos veces, ya que mucha gente puede tener una convulsión en algún momento de su vida, sin que por eso sea considerada epiléptica. “Al grupo de crisis generalizadas se lo puede dividir en tónico-clónicas, también conocidas como gran mal (actividad desordenada de brazos y piernas, acompañada por lo general de mordedura de lengua), y en petit mal; en los chicos se las conoce como “ausencias”. Estas son crisis que se presentan de manera no convulsiva hasta aproximadamente los 12 años de edad. Solo entre un 10% y un 15% de las personas tienen ausencias y además convulsiones después de los 12 años”. Refiere el doctor Alfredo Thompson, Jefe de la Sección Epilepsia del Hospital Francés para el Manual farmacéutico en mayo 2004, en su sección literaria.

1.2. La epilepsia con el paso del tiempo

La epilepsia es posiblemente la enfermedad más conocida desde la antigüedad, el concepto de epilepsia deriva de la palabra griega *epilambaneim* que significa ser agarrado, ser atacado, enfermedad que se manifiesta por medio de ataques, actualmente denominados crisis. Fue citada en el código de Hamurabi 2000 años antes de Cristo muy extendida en el antiguo oriente era denominada como el “morbo sacro”. El pueblo hebreo solo conocía para su tratamiento la invocación de potencias sobrenaturales mediante oraciones, hechizos y exorcismos.

Fue **Hipócrates** médico griego nacido en la isla de Cos en el mar Egeo 460 años antes de Cristo, llamado padre de la



medicina quién hizo una serie de estudios y los reunió en el libro *Del morbo sacro* diciendo “que los hombres consideran divinas su naturaleza y su causa, por su ignorancia, y por el estupor que inspira, porque este mal no se parece a otro alguno...”, también sugirió medios de diagnóstico y tratamiento, fue el comienzo para distinguir entre crisis epiléptica y posesión diabólica. (Grijalbo, Ed. 1973).



En la medicina romana: **Galeno** (129 - aprox. 200):

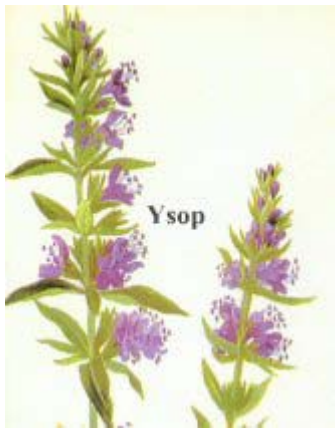
Decía que existen tres formas de epilepsia, “común a todas es, que el cerebro está enfermo; bien sea porque la enfermedad se encuentra en el mismo cerebro, o porque la enfermedad sube

por simpatía de la boca del estómago al cerebro. [...] En muy

raras ocasiones sucede que comienza desde cualquier otra parte del cuerpo, según informa el paciente, y desde allí sube hasta la cabeza”.

En la medicina Bizantina: **Alejandro de Tralleis** (525-605 d C.) en **Doce libros sobre medicina** (Liber I, Capítulo 15) “La prueba de que la epilepsia comienza en el estómago es que en éste se origina un malestar y desazón y que después el enfermo siente la cercanía del mal”.

Se recomendaba que: tan pronto como el enfermo se levante a



la mañana y realice una deposición, debe beber una tisana de “**hisopo**”, muy beneficiosa para él, ya que muchos se han curado con su uso, es decir “que no sufrieron la enfermedad más de dos o tres veces”. Otras veces se recurría al uso de la “verbena”, planta medicinal, beneficiosa para las crisis, tengamos en cuenta que la

“verbena” no cura la enfermedad.



En la Medicina del Renacimiento:

Paracelso (1493 - 1541) escribe *Sobre las enfermedades que nos privan de la razón*

(1525) “Y cinco son los lugares dónde se asienta semejante enfermedad que nos hace caer: una está en el cerebro, la otra en el hígado, la tercera en el corazón, la

cuarta en los intestinos [entrañas], la quinta en las extremidades. [...] Y no se encuentra sólo en el hombre sino en todo aquello que tenga vida, en los animales que también se caen de la misma manera que los hombres y en el temblor de la tierra [terremoto] que también se asemeja y tiene los mismos orígenes que la enfermedad que hace caer. [...]

Comunicamos que es imposible curar su raíz, aunque si es

posible regular que su raíz no crezca más."



La medicina en el siglo XVIII nos deja los escritos de **Samuel Augusto D.Tissot** (1728-1797): Tratado sobre la epilepsia o disposición a la caída (1771)

"Para poder curar esta enfermedad, hay que esforzarse primero en investigar, si existe algún origen simpático, en qué se basa y cuál es; si es idiopático, es decir: si

está motivado meramente por la gran excitabilidad. Por fin se ha convertido **la valeriana**, afortunadamente, en el remedio favorito de todos los médicos razonables. Estoy convencido de que cuando ésta no da resultado es porque el mal es incurable."

Observamos que se recurre a una planta medicinal que aún hoy se utiliza en farmacia.

En el arte, la epilepsia fue tema que atrajo a muchos a representarla en los diferentes momentos de la historia, la pintura más famosa de un enfermo epiléptico es el último cuadro de Raffael (Raffaello Santi, 1483-1520) La transfiguración de Cristo, que se puede apreciar en los Museos del Vaticano, en Roma.

Está dividido en dos partes: la parte superior muestra la transfiguración de Cristo, la inferior, muestra la curación de un muchacho "lunático" (epiléptico) que en los Evangelios de los Sinópticos (Mateo, Marcos, Lucas) sigue inmediatamente a la descripción de la transfiguración, el cuadro sin terminar de Rafael tiene en la mitad inferior, el siguiente texto bíblico (Mt. 17,14-20,): *"Llegado al lugar donde le aguardaban las gentes, vino un hombre, e hincando las rodillas ante él, le dijo: "Señor, ten compasión de mi hijo, porque es lunático, y padece mucho: pues cae en el fuego, o en el agua muy a menudo. Ya lo he*

presentado a tus discípulos, pero no han podido curarle."

Entonces dijo Jesús: ¡Oh generación incrédula y necia! ¿Hasta cuándo he de vivir con vosotros? ¿Hasta cuándo habré de sufriros? Traédmelo acá. Entonces Jesús amenazó al demonio.

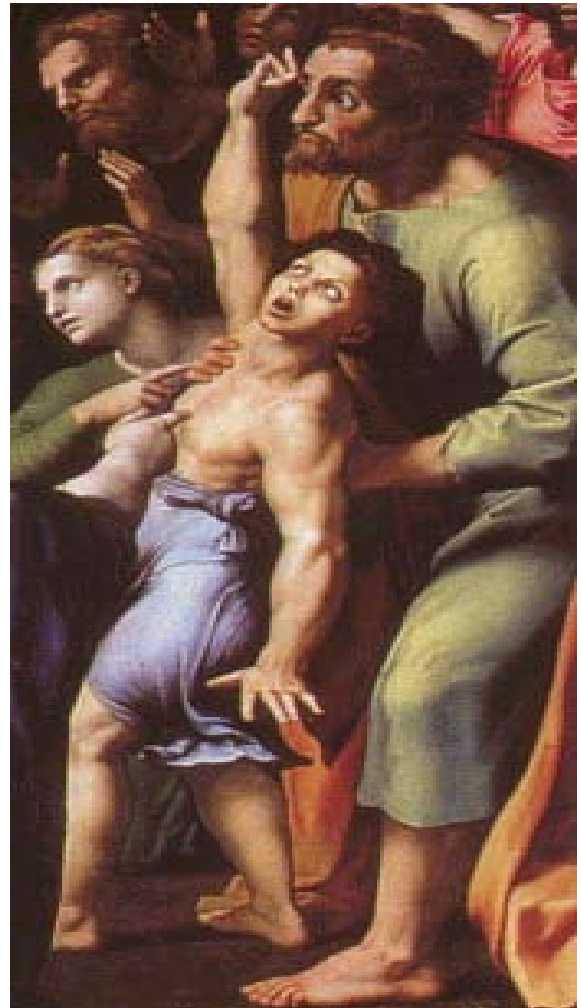
El demonio salió del muchacho y éste quedó curado desde aquel momento". Luego los discípulos le preguntan, como se cura este tipo de dolencias y Jesús contesta con ayuno y oración. Podría ser esto una forma similar a la dieta

cetogénica. No se sabe cómo esta dieta actúa. Hace mucho tiempo, cuando la mayoría de las medicinas para prevenir las convulsiones no estaban disponibles, algunos neurólogos notaban que sus pacientes tenían menos convulsiones cuando no comían bien. La dieta pretende imitar los efectos de morir de hambre. El cuerpo normalmente usa azúcar y glucosa para producir energía. Con la dieta cetogénica, el cuerpo adopta un metabolismo que consume grasas de la misma manera que lo hace cuando hay hambre. Uno de los productos finales del metabolismo de grasas es la formación de cetonas que se acumulan en la sangre. La dieta cetogénica proporciona la suficiente grasa para producir cetonas. Esta acumulación de cetonas tendría un efecto antiepiléptico (Redick Syliva 2007). La escena representada muestra como el padre (lleno de esperanza, por eso lleva la túnica pintada de verde), trae a su hijo ante los discípulos. En el momento captado en el cuadro refleja la crisis epiléptica que está sufriendo el muchacho: parece que no puede mantener la postura y por eso tiene que ser sostenido por el padre. Durante la crisis las extremidades del muchacho están rígidas (tónicas) y contraídas, la boca está ligeramente abierta, los labios azulados, los ojos fijos y en posición bizca. Se trata ciertamente de una de esas crisis, que empujan al "lunático", si éste no se encuentra bajo el cuidado de los suyos, "al fuego o al agua". En este contexto es digno señalar, que en el cuadro

de Rafael el único enlace entre ambas escenas, es el muchacho "lunático", siendo éste el único de las muchas personas de la parte inferior del cuadro, que se dirige hacia el Cristo transfigurado de la parte superior.



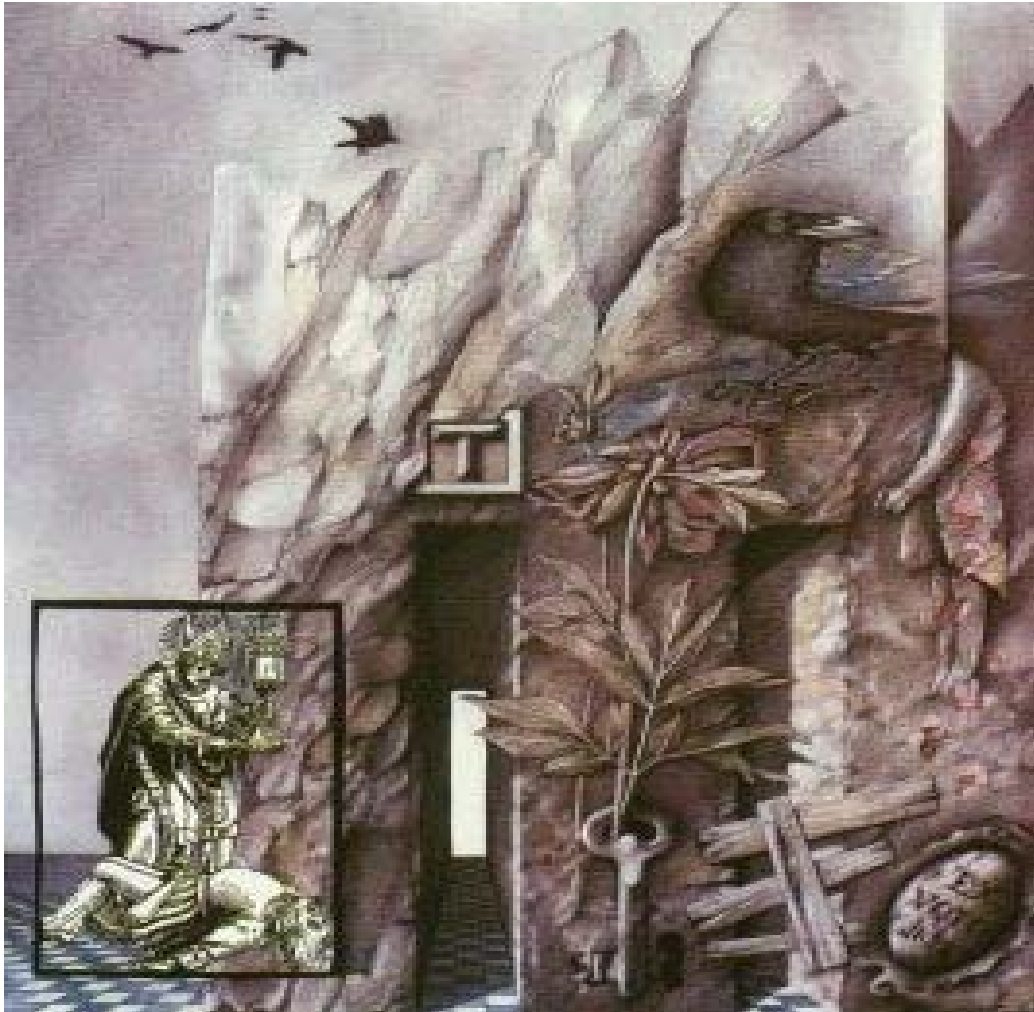
La transfiguración de Cristo de Rafael



Parte inferior del cuadro ampliado

En el arte moderno hay un ejemplo en que la epilepsia es tratada con el uso de una planta medicinal, la "peonia".

El artista Karlheinz Geier en 1983 dibujó: **El mundo simbólico de la epilepsia**. La misma se representa como una cadena montañosa insalvable, peligrosa y de gran altura, que corta el camino (de la vida) del enfermo epiléptico. Cuervos, como símbolo del diablo, de los espíritus malditos y de los demonios de la enfermedad sobrevuelan el macizo montañoso.



Dibujo: El mundo simbólico de la epilepsia de Karlheinz Geier

Están presentes alusiones a San Valentín, protector de la epilepsia, la “peonía” (rosa montés), cuyos componentes (hojas, tallos, flores, raíces, semillas) servían en la Antigüedad y Época Medieval como remedio contra la enfermedad; la llave que serviría tanto para abrir la mandíbula cerrada herméticamente, como para que los miembros contraídos durante la crisis perdieran intensidad; el cadáver de un ahorcado (en la Antigua Roma, también, en la Edad Media y hasta el siglo. XIX, la sangre de un ajusticiado era el remedio escogido contra la epilepsia).

Ninguna de estas medidas ayudaron en modo alguno a combatir la temida enfermedad, el paso a través de "la

montaña de la enfermedad" quedó bloqueado, (apuntalado entre llaves y exvoto). Y sin embargo, queda un camino de esperanza, un paso aún sin cortar, deja intuir "luz en el túnel". Está sobrescrito con una gran "T", quizás símbolo de una terapia, moderna y con fundamentos médicos, contra la epilepsia.

La epilepsia no tiene relación con enfermedad o deficiencia mental, esto lo demuestran algunos "genios" que a pesar de las crisis epilépticas han demostrado tener dotes superiores al promedio, también figuran famosos, artistas, deportistas y políticas, por ejemplo: Vincent van Gogh, G. Julio Cesar, Gustavo Flaubert, F.M. Dostojewskij, Pablo de Tarso, Herakles, Napoleón Bonaparte, Erzherzog Karl, Pio IX., Luis II., Alfredo Nobel, Molière, Juana de Arco, Wladimir Iljitsch Lenin, Sócrates, Cardenal Richelieu, Margaret Hemingway.

En la lista las mujeres casi no están presentes y es debido a que antiguamente las condiciones sociales de las mismas eran mucho mas difíciles que para los hombres, cabe aclarar que en las mujeres se da con igual frecuencia que en el hombre. Actualmente los afectados que ejecutan una actividad pública les resulta difícil confesar y aceptar la enfermedad, aún está adherida a la epilepsia la discriminación, así epilépticos famosos viven de incógnito, gracias a la medicina moderna, sin ataques y perjuicios psicosociales importantes. (Museo alemán de la Epilepsia en Kork)

Actualmente es la enfermedad crónica neurológica que se da con mayor frecuencia, afecta a millones de personas en el mundo, la mayor parte en países subdesarrollados, de los 9 millones que padecen la enfermedad en América Latina más de un tercio de ellas no tienen acceso a un tratamiento.

Cada año 80 de 100.000 personas se le manifiesta la enfermedad en Latinoamérica, particularmente a causa de

mala atención en el embarazo, en el parto, por afecciones en el Sistema Nervioso Central, y a condiciones socioeconómicas deficientes entre otras.

Debido a la magnitud biopsicosocial de la epilepsia en el mundo, en el año 1997 se inició una campaña con la intervención de varias organizaciones: OMS (Organización Mundial de La Salud), OPS (Organización Panamericana de La Salud), IBE (Buró Internacional para la Epilepsia), la ILAE (Liga internacional contra la Epilepsia), para “conducir la epilepsia fuera de las sombras” junto a los gobiernos, la Sociedad, los equipos de salud y las personas con epilepsia. (Miranda Claudio, 2000).

1.3. Mecanismos que posiblemente intervienen en el desarrollo de la crisis epiléptica

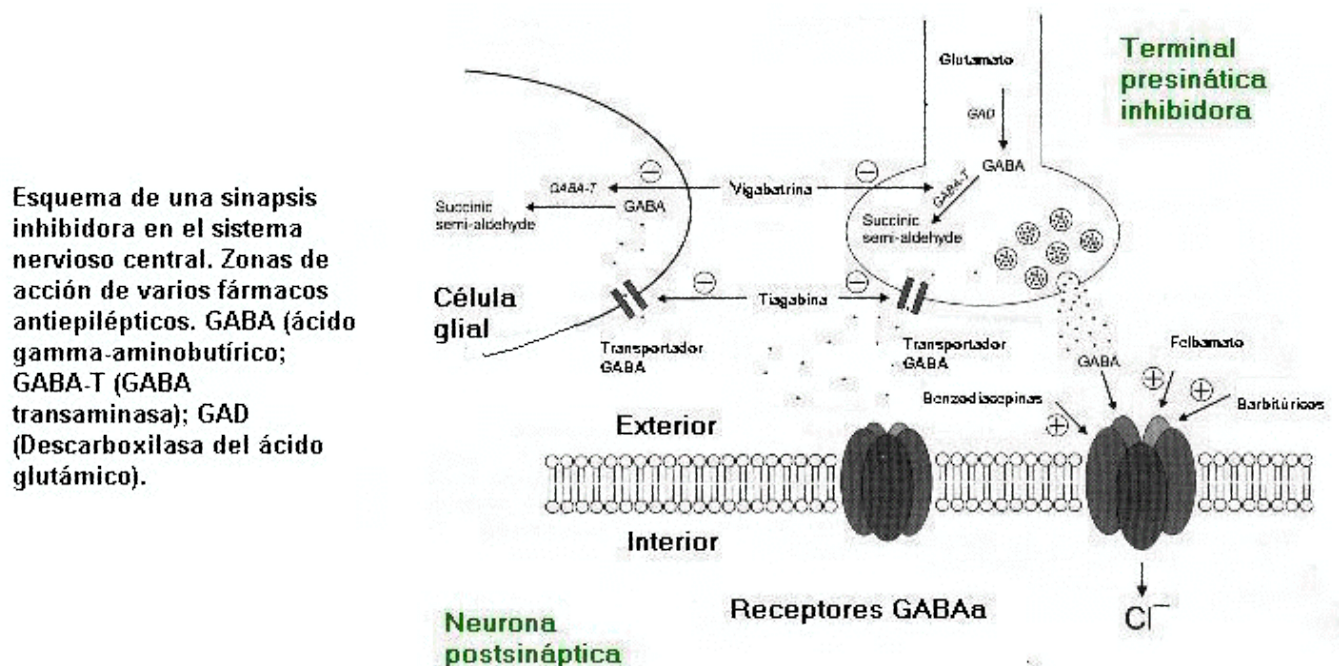
Se enumeran las posibles causas responsables de las crisis epilépticas

- a. Cambios en estructura y función de las proteínas de membrana.
- b. Niveles alterados de neurotransmisores (GABA, glutamato) y neuropéptidos endógenos. Alteraciones en el receptor GABA. Potenciación de las respuestas mediadas por receptores glutaminérgicos con alteraciones en el flujo iónico.
- c. Cambios en la relación intra y extracelular de iones. Aumento de iones potasio en el espacio extracelular que favorece una hiperactividad constante.
- d. Influencias colinérgicas y monoaminérgicas sobre la zona epileptógena que pueden hacer variar su extensión intercrítica.
- e. Se postulan posibles anomalías en la migración neuronal durante la 7^a-10^a semana de gestación, las que serían el denominador común de la crisis.
- f. Las neuronas del tálamo tienen una propiedad intrínseca: "Corriente en T o corriente de bajo umbral" regulada por iones calcio. Genera espículas/ondas a un ritmo de 3/seg. Así, en contraste con el pequeño tamaño de estas neuronas talámicas, la corriente en T amplifica las descargas. Meilán (2000)

1.4. Tratamiento médico

El primer tratamiento médico eficaz utilizado en el control de la epilepsia se basaba en el uso de depresores no específicos del SNC. Sir Charles Locock introduce los bromuros en la mitad del siglo XIX y el fenobarbital fue adaptado en 1912 después de las observaciones de Hauptmann. Actualmente han surgido una serie de nuevos antiepilépticos que intentan incrementar la eficacia del tratamiento y reducir los efectos secundarios.

Los mecanismos principales de actuación de los fármacos anticonvulsivos son tres, sin embargo por lo general los fármacos tienen más de un mecanismo de acción anticonvulsivo.



A. **La inhibición sináptica mediada por el GABA, está aumentada.** En presencia del GABA, el receptor GABAa, se abre y se produce un flujo de iones cloro que aumentan la polarización de la membrana. Existen fármacos que disminuyen el metabolismo del GABA (ácido valproico,

vigabatrina) y otros actúan sobre el receptor GABA_A (barbitúricos, benzodiacepinas, felbamato, topiramato).

B. Inhibición de los canales de iones sodio

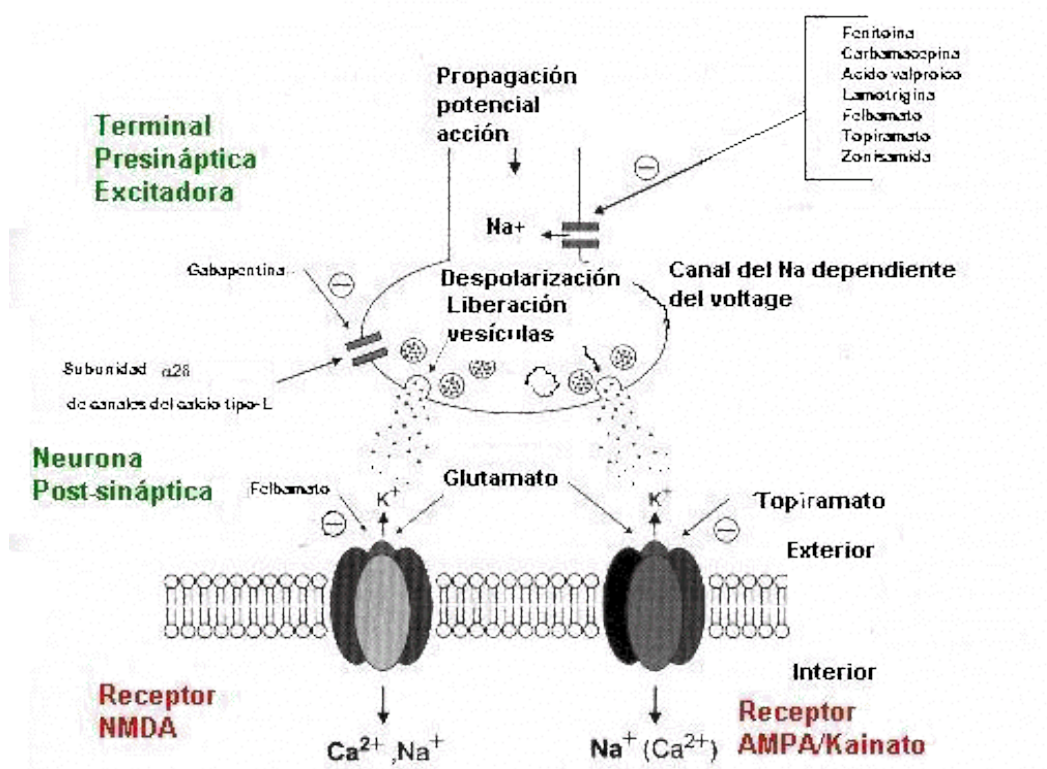
(hidantoinas, carbamacepina, ácido valproico, lamotrigina, felbamato, topiramato, zonisamida) y del calcio

(pentobarbital). Algunos también actúan sobre los receptores del glutamato.

C. Reducción o inhibición del flujo de calcio a través de los canales de calcio tipo T (principal

mecanismo de los fármacos que controlan las crisis de ausencia): ácido valproico, etoxusimida, trimethadiona, zonisamida.

Meilán (2000)



Esquema de la sinapsis excitadora en el sistema nervioso central. Zonas de actuación de fármacos antiepilépticos. NMDA (N-metil-Daspartato). AMPA (Ácido Alfa-amino-3-OH-5-metil-4-isoxazoleproprionico).

1.5. Antecedentes de Plantas utilizadas como anticonvulsivas

El hombre observó el beneficio de las plantas medicinales usándolas, en forma empírica, Alejandro de Tralleis recomendaba: una tisana de flores y hojas de “hisopo” *Hyssopus officinalis*, y la “verbena” *Verbena officinalis* (también llamada “hierba santa”), hoy se sabe su composición: Iridoides (0.2-0.5%). Verbenalina (0.15%), hastatósido (0.08%), dihidroverbenalina (0.01%). Flavonoides. Luteolina, escutelarina, artemisina, sorbifolina, pedalitina, eupafolina. Derivados del fenilpropano. Verbascósido (0.8%), eucovósido, martinósido.



www.meemelink.com/prints%20pages/16838.Verben...

Verbena officinalis

Hoy se conoce que la verbena produce una ligera depresión del sistema nervioso central por su efecto hipnótico. Los iridoides ejercen un efecto calmante sobre la mucosa respiratoria, inhibiendo el reflejo de la tos. Se ha comprobado en ensayos sobre animales, que la verbena aumenta la producción de jugos gástricos (PDR 2000).

Antiguamente era frecuente el uso de la “Peonia”, *Paeonia officinalis* particularmente sus pétalos, semillas y raíces. Sus principios activos conocidos son: Peonol (alcohol derivado de la acetofenona), paeoniflorina, un antocianósido: peonina (responsable de la coloración de la flor), además taninos, aceite, resina, azúcares, ácidos orgánicos.

El peonol se comporta como antiinflamatorio, analgésico, antiácido, antiulceroso y antibacteriano. La paeoniflorina es sedante, hipnótico, antitusivo, ligeramente espasmolítico, analgésico y anticonvulsivante. Los antocianósidos son responsables del efecto venotónico y vasoprotector. (Arteche García, Alejandro.1998)



Paeonia officinalis

<http://www.hipernatural.com/images/plantas/peonia.jpg>

Los escritos de Samuel Augusto A. D. Tissot (1728-1797) proponían a la raíz de “valeriana”, *Valeriana officinalis*, como el remedio favorito de todos los médicos razonables.

La “valeriana” ha sido ampliamente estudiada por su uso ancestral contra la epilepsia y su actividad depresora a nivel del SNC.

La droga está constituida por las raíces y rizomas de *Valeriana officinalis* (Valerianácea). En su composición se encuentran:

- Esencias en una proporción de 0,3-0.7% de olor desagradable conteniendo acetato de bornilo, isoeugenol y sesquiterpenos (ácidos valerénicos).
- Monoterpenos bicíclicos: 0,5-2% altamente inestables mezcla de iridoides conocidos como valepotriatos (valtrato, dihidro-valtrato, isovaltrato)
- Productos de deshidratación de los valepotriatos (baldrinal y homobaldrinal).

La raíz de valeriana es sedante del SNC. Los valepotriatos son espasmolíticos disminuyendo la motilidad y la agresividad. Estudios clínicos con doble ciego y en largo plazo demostraron en el hombre actividad ansiolítica, tranquilizante débil, ligeramente hipnótica, débilmente hipotensora.

- La forma de utilización de la infusión de raíz estabilizada (2-5 g/l) No se detectaron efectos secundarios en clínica. (Bruneton, J. (1995).

En un tiempo reciente un grupo de investigadores descubrieron que el efecto del ácido valerénico se potenciaba si se administraba por coinyección con el glucósido de la flavona acacetina o linarina que se obtiene también de *Valeriana officinalis* lo mismo ocurre si se administra con hesperidina. (Paladini A. 2005) Demostrando la acción

sinérgica de principios activos vegetales.

Otro ejemplo es la “**Pasionaria**”



Passiflora coerulea

(<http://en.chinabroadcast.cn/mmsource/image/2005-11-5/Passiflora-Coerulea.jpg>)

Passiflora coerulea (Pasifloraceae) de nombre común, “pasionaria”, “maracuyá”, “granadilla” entre otros. Existen numerosas especies de “Pasiflora”.

La parte aérea y también la raíz es lo que se utiliza en la medicina folclórica como sedante. Contiene alcaloides indólicos del harmano (0.01%) flavonósidos 1.5-2.2% en hojas y flores), cianoglicósidos, cumarinas, pironas, etc. (Wakksman J.2002)

La acción farmacológica ansiolítica se ensayó en ratón y se atribuye a un flavonoide, crisina, se ha encontrado la misma actividad en otras especies vegetales que tienen flavonoides derivados de flavonas, ejemplos son *Matricaria recutita*, *Tilia tomentosa* y *Salvia guaranítica*. (Paladini A. 2005.)

Con respecto al uso de *Cannabis sativa* ("Marihuana") que es propuesto, según indicación terapéutica como antiepiléptico, los experimentos con animales han evidenciado el efecto antiepiléptico de algunos cannabinoides, y que la actividad anticonvulsivante de la fenitoína y del diazepam se ven potenciados con el THC (tetra hidro cannabinol). Pocos casos han sido capaces de controlar totalmente los síntomas epilépticos mediante el uso de la Marihuana. También se ha de mencionar que el cannabis puede ocasionalmente inducir convulsiones. (Asociación internacional por el Cannabis como medicamento, 2007)

Un gran número de plantas medicinales fueron utilizadas en el tratamiento de convulsiones en la medicina tradicional, algunos autores han realizado revisiones y son dignos de mención, Adesina (1982) y posteriormente Ashok y col. (1988), sobre estudios fitoquímicos y farmacológicos de plantas utilizadas como anticonvulsivas.

En el cuadro de las páginas siguientes se presentan algunas de las muchas especies que han sido estudiadas, se puede apreciar que mayormente ensayaron algún tipo de extracto y en otras se han logrado aislar compuestos responsables de la actividad observada.

	Planta medicinal	Familia	Composición química	Actividad observada según autores
1	<i>Acorus calamus</i> Ashok y col. (1988)	Araceae	Aceites esenciales	Efectivo en convulsiones inducidas con metrazol.
2	<i>Adonis vernalis</i> Ashok y col. (1988)	Ranunculaceae	Adonisido, adonitoxigenina-3-(O- α -L-rhamnósido)- β -D-xilósido, adonitoxigenin-3-[O- α -L-(2'-O-acetil)-rhamnósido]- β -D-xilósido, adonitoxigenina-3-[O- α -L (3'-O-acetil) rhamnósido] β -D-xilósido.	Anticonvulsivo
3	<i>Aeollanthus suaveolens</i> Elisabetsky y Coelho de Souza , (1999)	Lamiaceaea	Linalol, τ - decanolactona.	Anticonvulsivo (en convulsiones inducidas por electroshok y PTZ)
4	<i>Afraegle paniculada</i> Ashok y col. (1988)	Rutaceae	Scoparone, imperatonina y xanto- xiletina	Anticonvulsivo
5	<i>Apium graveolens</i> Ashok y col. (1988)	Umbelliferae	3- n Butylphthalide(ftalato de butilo y 3- n -butyl-4,5-dihydrophthalid (3-n-butyl-4,5,dihidroftalato)	Anticonvulsivo
6	<i>Asparagus officinalis</i> Ashok y col. (1988)	Liliaceae	-	Anticonvulsivo (en convulsiones inducidas por electroshok)
7	<i>Astragalus centralpinus</i> Ashok y col. (1988)	Papilionaceae	Isoramnetina-7-O-ramnósido, isoramnetina-7-O-ramnósido isoramnetina-3-O-glucó - biósido, isoramnetina-3-O-glucoramnósido, 5,7, 4'-trihidroxi-3,3'dimetoxiflavona, 3,5, 7,3'-tetrametoxi-4'-hidroxiflavona., 3,7-dihidroxi flavona, 4',5-dimeto-xi-7-	Revierde las convulsiones producidas por Cl ₂ Ba,acetilcolina e histamina

			hidroxiflavan-7-ol.	
8	<i>Cannabis sativa</i> Ashok y col. (1988)	Urticaceae	Cannabinoides 11-hidroxi- Δ^8 -tetrahydro cannabinol y 11-oxo- Δ^8 tetrahydro-cannabinol, tetrahydrocannabidivarinico, cannabidivarinico, cannabichromevarinico y ácidos cannabigerovarinicos	Antiepiléptico. Contra gran mal, Fococortical convulsiones complejas y parciales y inducidas por PTZ (30mg/kg.oral)
9	<i>Canscora decussata</i> Ashok y col. (1988)	Gentianaceae	Extracto, 1,3,5-tri-y 1,3,5,6,7-penta-oxi-xantona	Anticonvulsivante
10	<i>Caparris caduca</i> Ashok y col. (1988)	Capparidaceae	Alcaloide (fórmula mol. $C_{19}H_{18}O_2N$)	Anticonvulsivante
11	<i>Cinchona officinalis</i> Ashok y col. (1988)	Rubiaceae	quinina	Antiepiléptico
12	<i>Clausena anisata</i> Ashok y col. (1988)	Rutaceae	Helittina y imperatorina Extracto metanólico de raíz y corteza.	Anticonvulsivante
13	<i>Claviceps purpurea</i> Alcaloides Ashok y col. (1988)	Scrophulariaceae	D- LSD-25 (La dietilamida de ácido lisérgico)-, ergocornina, hidrogenmaleinato(1-2mg/kg), Bromocriptina(0.5-4mg/kg) LSD-tartrato de ergotamina	Inhibición de las convulsiones epilépticas bloqueo de respuestas mioclónica en el hombre
14	<i>Cnestis glabra</i> Ashok y col. (1988)	Connaraceae	Glabrina (S-(amino-3-carboxy-propil)-5-Mesulfoximine	Efectivo contra ataque convulsivo
15	<i>Convolvulus arvensis</i> Ashok y col. (1988)	Convolvulaceae	Umbeliferona, escopoletina y ácido ferúlico.	Anticonvulsivante
16	<i>Coriandrum sativum</i> Adesina, S.K.(1982)	Apiaceae =Umbeliferae	Extracto hidroalcohólico (semillas)	Anticonvulsivo (efectivo en convulsiones inducidas por electroshock y PTZ) 5mg/kg
17	<i>Cynodon dactylon</i> Odenigbo y col.(1993)	Gramineae (Poaceae)	Extracto etanol / agua parte aérea (proteínas, carbohidratos, glicósidos, saponinas, taninos, flavonoides, amino-	Activas contra electro-shocks 400 mg/kg No en convulsiones

Introducción

			ácidos (prolina, asparagina y glutamina)	producidas por PTZ.
18	<i>Delphinim consolida</i> Ashok y col. (1988)	Ranunculaceae	5-cis-acido eicosanoico	Anticonvulsivante
19	<i>Duboisia leichhardii</i> Ashok y col. (1988)	Solanaceae	Isobutiroilatropina , valeroilatropina	Anticonvulsivante
20	<i>Echinacea purpurea</i> Ashok y col. (1988)	Asteraceae	Pendimoid y echinacina	Anticonvulsivante
21	<i>Echium vulgare</i> Ashok y col. (1988)	Boraginaceae	Extracto	Anticonvulsivante
22	<i>Erythroxylum spp.</i> Ashok y col. (1988)	Erythroxylaceae	Cocaína	Antimetrazol.
23	<i>Euphorbia pilulifera</i> Ashok y col. (1988)	Euphorbiaceae	Extracto	Acción profiláctica contra convulsiones en chanchitos de la India.
24	<i>Eugenia caryophyllata</i> Pourgholami y col.(1999)	Myrtaceae	Aceite esencial de botones florales: Eugenol, carvacrol, β - cariofileno, α -humuleno i.v.	Activas contra electro-shocks y convulsiones producidas por PTZ.
25	<i>Galicia sp</i> Ashok y col. (1988)	Galiaceae	Adenocarpina y santiaguina	Anticonvulsivante
26	<i>Galium cruciata</i> , G. <i>Sylvaticum</i> Ashok y col. (1988)	Galiaceae	Flavonoides, glucósidos, taninos y cumarinas	Usado en medicina folclórica como antiepiléptico
27	<i>Gastrodia elata</i> Ha Hee Jeoung, y col (2000) Ashok y col. (1988)	Orchidaceae	Fracción éter, del extracto metanólico 4- hydroxibenzaldehído	Anticonvulsivante
28	<i>Haplophyllum</i> <i>perforatum</i> , Ashok y col. (1988)	Gesneriaceae	Haplofillidina (en semillas) Haploperina	Anticorazole y antialcanfor LD50=500mg/kg
	<i>H. Lociosum</i>		Foliosodin(I) I-HCL y I-HBr	anticorezole y antiestricnina
	<i>Haplophyllum sp.</i>		Dubinin	Anticonvulsivante LD50 61.6m g/kg ev., y 108.4 mg/kg oral

29	<i>Heracleum sibiricum</i> y <i>H. Verticilatum</i> Ashok y col. (1988)	Umbeliferae	Spliondina, pimpinelina, Iso-pimpilenina, bergapteno, Iso-bergapteno, angelicina y sustancias no identificadas	Activas contra electroshocks y convulsiones producidas por PTZ, anticorazole (155 mg/kg.) pero no para estricnina.
30	<i>Herpestris monniera</i> Ashok y col. (1988)	Escrofulariaceae	Fracción activa	Efecto tranquilizante
31	<i>Kochia prostrata</i> Ashok y col. (1988)	Chenopodiaceae	Extracto etanólico	Previene convulsiones inducidas por Estricnina
32	<i>Indigófera suffruticosa</i> Pérez de Alejo José L., y col. (1998)	Fabaceae	Fracciones butanólica y acetato de etilo	Protegen convulsiones inducidas por electro-shock y picrotoxina
33	<i>Lavandula atoechas</i> Gilani A.H., y col. (2000)	Lamiaceae	Extracto metanol/agua de flores	Reduce las convulsiones inducidas por PTZ en ratones. Dosis: 600mg/Kg.
34	<i>Leonurus cardiaca</i> Ashok y col. (1988)	Fabaceae	Leocardina, rutina, quercitrina, quinquelósido, iso-quercitrina, Hiperósido, quercitina-7-O-D-glucósido, kanferol-3-O-D-glucósido, y apigenina-7,5- y 4'-O-D-glucósido. Ajugol, ajugósido, galiridosido y 3,4- más un iridoide no identificado	Antiepiléptico
35	<i>Licaria puchurymajor</i> Ashok y col. (1988)	Lauraceae	Fracción aceites esenciales, safrol, eugenol, metileugenol, (en semillas) 3,4-metilendioxicinamilaldeído, 3,4-metilendioxicinamil alcohol y ácido siríngico (corteza)	Reduce la actividad motora. Protege contra las convulsiones poscoroneal electroshock

36	<i>Magnolia officinalis</i> <i>M. obovata</i> Ashok y col. (1988)	Magnoliaceae Magnoliaceae	Magnold (100 mg/kg) y honokiol Siringina, coniferina, obovitol, ovobatal, Magnolol y honokiol	Previene convulsiones de Extensión tónica. Anti:estricnina, PTZ antipicrotoxina
37	<i>Marsilea rajasthanensis</i> <i>M. Minuta</i> Ashok y col. (1988)	Marsileaceae	Marsilina	Anticonvulsivante Antiepiléptico.
38	<i>Marrubium vulgare</i> Ashok y col. (1988)	Lamiaceae	Polvo de hojas y flores	Usada contra migraña
39	<i>Mytragyna africanus</i> Aji B. M., y col., (2001)	Rubiaceae	Extracto metanólico	Protege convulsiones inducidas por Estricnina.
40	<i>Nardostachys jatamansi</i> Ashok y col. (1988)	Valerianaceae	Jatamansinona	Anticonvulsivante y antiarritmico
41	<i>Oleum chammonillae, O.</i> <i>millefolii</i> Ashok y col. (1988)	Gadidae	Extractos	Anti-PTZ
42	<i>Paeonia lactiflora</i> Tsuda Tadashi, y col. (1997)	Paeoniaceae	Extracto acuoso de raíz conteniendo paeoniflorin, albiflorin(galotaninos)	Protección en modelo epiléptico inducido con Cobalto
43	<i>Panax ginseng</i> Ashok y col. (1988)	Araliaceae	Saponinas (hojas), Saponinas (raíz) (10 ó 50 %) solución salina ip.	Neuroléptico, analgésico anticonvulsivante y antipirético
44	<i>Patrina intermedia</i> Ashok y col. (1988)	Fabaceae	Glicósidos terpénicos neutros y acidicos.	Disminuyen las convulsiones pro- ducidas por estric- nina 1mg/kg, s.c.
45	<i>Picnomon acarna</i> Ashok y col. (1988)	Asteraceae	Alcaloides	Sedante y anticonvulsivante.
46	<i>Piper methysticum, P.</i> <i>nigrum</i> Ashok y col. (1988)	Piperaceae	Dihidrokaawaína, yangonin, kawaína, dimetoxiyangonin, Metisticina y dihidrometisticina anti- epilepserin	Protege contra convulsiones inducidas por estricnina. Antiepiléptico
47	<i>Pitecolobicum saman</i>	Fabaceae	Alcaloides	Antipicrotoxina y

	Ashok y col. (1988)			contra convulsiones audiogenicas
48	<i>Plecthranthus amboinicus</i> Menéndez Castillo R. y Pavón González V. (1999)	Lamiaceae	Decocción de hojas	Antiepiléptico
49	<i>Rawolfia serpentina</i> Ashok y col. (1988)	Apocinaceae	Reserpina	Cambios de conducta en monos epilépticos
50	<i>Roylea elegans</i> Ashok y col. (1988)	Lamiaceae	Extracto etanólico LD50 700 mg/kg i.p. Extracto acuoso LD 50 1000 mg/kg ip.	Depresor SNC y anticonvulsivante
51	<i>Rubus brasiliensis</i> Nogueira E., Vassilieff V.S. (2000)	Rosaceae	Fracción hexánica	Anticonvulsivante, hipnótico.
52	<i>Salvia nemoroea sub especies amplexicantis, sclarea</i> Ashok y col. (1988)	Lamiaceae	Extractos	Actividad anticonvulsiva
53	<i>Serratia marcesens</i> Ashok y col. (1988)	Microorganismo marino	Sustancia antibiótica	Depresor SNC y Anticonvulsivante
54	<i>Sesbania grandiflora</i> Kasture y col.(2002)	Leguminoseae (Fabaceae)	Extracto éter de petróleo (hojas), fracción soluble en acetona y posterior fraccionamiento con benceno: acetato de etilo (triterpenos)	Anticonvulsivante y ansiolítico
55	<i>Solanum dasyphyllum</i> Ashok y col. (1988)	Solanaceae	Ferúlico y ácido p- cumárico, umbeliferona, scoparona ,esculetina, escopoletina, solasonina, solamarina, solanina ,tomatidenol y solasodine	Anticonvulsivante
56	<i>Taraxacum sps.</i> Ashok y col. (1988)	Asteraceae	Luteolin-7-glucósido y otro glucósido de flavonoides	Débil anticonvulsivante
57	<i>Techlea simplifolia</i> Ashok y col. (1988)	Rutaceae	N,N-Dimetil -4-Metoxi-phenylethylamine	Anticonvulsivante
58	<i>Thalictrum thumbergii</i>	Ranunculaceae	Talmina y O-metil talicberina	Antagonistas de

	Ashok y col. (1988)			excitación con fenamina
59	<i>Thalictrum hermandezii</i> Ashok y col. (1988)	Ranunculaceae	Hernandezina	Anticonvulsivante
60	<i>Trema orientalis</i> Ashok y col. (1988)	Urticaceae	Mezcla de flavonoides	Depresor fuerte del SNC, protege al 50% de animales contra el electroshock
61	<i>Uncaria sinensis</i> Ashok y col. (1988)	Pedaliaceae	Extracto	Antiepiléptico
62	<i>Valeriana officinalis</i> Ashok y col. (1988)	Valerianaceae	Valepotriatos valtrato, acevaltrato dihidro-valtrato valeridina, valeclorina y epi-7-desacetilovaltrato	Sedante del SNC Actividad antiarrítmica
63	<i>Veratrum viride</i> Ashok y col. (1988)	Melanthaceae ó Liliaceae	Veratrone -Sulfato de magnesio	Anticonvulsivante
64	<i>Vinca erecta</i> Ashok y col. (1988)	Apocinaceae	Ervinina.	Anticonvulsivante

1.6. Compuestos aislados de plantas con actividad anticonvulsivante

Numerosos compuestos han sido aislados de plantas medicinales a las cuales se atribuyen propiedades anticonvulsivantes, algunos de ellos se encuentran en la base de datos fitoquímica y etnobotánica Dr. Duke's (2005)

- ✓ ACIDO ACORICO
- ✓ ACIDO SHIQUIMICO
- ✓ ALFA-TOCOFEROL
- ✓ ANGELICINA
- ✓ ASARONA
- ✓ BERBERASTINA
- ✓ BERBERINA
- ✓ ACETATO DE BETA AMIRINA
- ✓ BILOBALIDO 30 mg/kg/day/orl mus
- ✓ CANNABIDIOL
- ✓ DICENTRINA
- ✓ DIHIDROMETISTICINA
- ✓ ERISOPINA
- ✓ ERISOTIOVINA
- ✓ ERISOVINA
- ✓ ESTRAGOL
- ✓ EUGENOL
- ✓ ONOKIOL
- ✓ IBOGAINA
- ✓ IMPERATORINA
- ✓ ISOPSORALENO
- ✓ JATAMANSONA
- ✓ KAWAINA
- ✓ LINALOOL 200 mg/kg ipr mus
- ✓ MAGNOLOL
- ✓ MALTOL
- ✓ METIL-EUGENOL
- ✓ METISTICINA
- ✓ NIACINA 3 g/day
- ✓ PAEONIFLORINA

- ✓ FLORIZINA
- ✓ PIPERINA 50-400 mg/kg ipr
- ✓ RESERPINA
- ✓ RUTINA
- ✓ SAFROL
- ✓ SCOPOLAMINA 5 mg/kg ipr mus
- ✓ SKIMIANINA
- ✓ TUBOCURARINA
- ✓ VISAMMINOL
- ✓ XANTOXILETINA

2. *Eugenia uniflora*

2.1. Nombres de *Eugenia uniflora*

Origen del nombre: *Eugenia*, en honor del Príncipe Eugenio de Saboya.

Uniflora = una sola flor, debido a sus flores solitarias.

Nombre científico: *Eugenia uniflora* L. Sp. Pl., 1:470. 1753. (ver Digilio 1966:86)

Sinónimos:

Eugenia. michelli Lam. ,

Eugenia .costata camb.

Eugenia pitanga Arech.

Stenocalyx pitanga Berg

Stenocalyx. strigosus Berg

Stenocalyx pitanga Auct. Div.Non Berg..

Stenocalyx michelli Berg.

Sus nombres más comunes en el NO de la Argentina son “pitanga” y “ñangapirí”. (Dimitri Milano (1988)

También se la llama “arrayán”, “sukesukelét”, “sukesukelí” (coloradito), “tajekok sukesukelét”, en lengua vilela; “taikó”, “taikók” en toba.

Es la mas ampliamente conocida de las especies *Eugenia*, por sus frutos comestibles, debido a su gran adaptabilidad, también denominada “Surinam cherry” (cerezo), “Roussaille”, en Brasil “Pitangueira” o “Brazilian cherr”, “Cayenne cherry”, y Florida

“Cherry”.

En España es generalmente “Cereza de Cayena”, en Venezuela “pendanga”, en El Salvador “guinda”, en Colombia “cereza cuadrada”. En Guadalupe y Martinica es llamada “Cereza á côtes o cerises-cotes”; en Guayana Francesa, “Cerise de pays, cerise de Cayenne o cerise carré”, en Surinam, “Surinaamche Kerssh”, “Zaete Kers”, o “monkie kersie. (Morton, J. 1987).

2.2. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Subclase: Rosidae.

Orden: Myrtales.

Familia: Myrtaceae.

Género: *Eugenia*.

Especie: *Eugenia uniflora*.

(International Plant Names Index 2006)

2.3. Descripción de la planta

Eugenia uniflora L. Arbusto ramificado y globoso, tomando a veces el tamaño y forma de arbolito.

Hojas opuestas, glabras, subsésiles, aovado-lanceoladas, de 2,5-5 cm. de largo.

Flores blancas, de 1-1,5 cm. de diámetro, dispuestas en largos pedúnculos axilares unifloros, fasciculados. (Dimitri Milanj 1988)



Flores de *Eugenia uniflora*.

[http://www.rain-tree.com/Plant-Images/Eugenia_uniflora_p3jpg.jpg]

Fruto: es una baya depreso-globosa, de 2-3 cm de diámetro, rojo o purpúrea, con el pericarpio surcado longitudinalmente, formando costillas redondeadas. En Argentina la planta es usada como ornamental, frutal, y medicinal. Se reproduce por semillas.



Frutos de *Eugenia uniflora*

([http:// www.rain-tree.com/ Plant-Images/](http://www.rain-tree.com/Plant-Images/))

Los niños disfrutan de los frutos maduros, son cortados verticalmente en un costado, extendidos abiertos para liberar las semillas y mantenidos fríos durante 2 a 3 hs. ayuda a disipar la mayoría de sus caracteres aromáticos resinosos.

Estos frutos son a menudo empleados en mermelada, jalea, condimentos. En Brasil se fermenta el jugo en vinagre o vino, y suele ser usado para elaboración de un licor.

2.3.1. Toxicidad

Las semillas no deberían ser usadas como alimento, pues se ha observado cuadros de diarrea ocurrido en perros que comieron frutos enteros.

La emanación aromática de ramas irritan las vías respiratorias en personas. (Morton, J. 1987).

2.3.2. Otros usos populares

Las hojas esparcidas por los pisos de casas brasileñas, liberan un aceite picante el que se utiliza como repelente de las moscas. (Morton, J. 1987).



Hojas de *Eugenia uniflora*

<http://www.guayubira.org.uy/images/Botanico/Pitanga.jpg>.

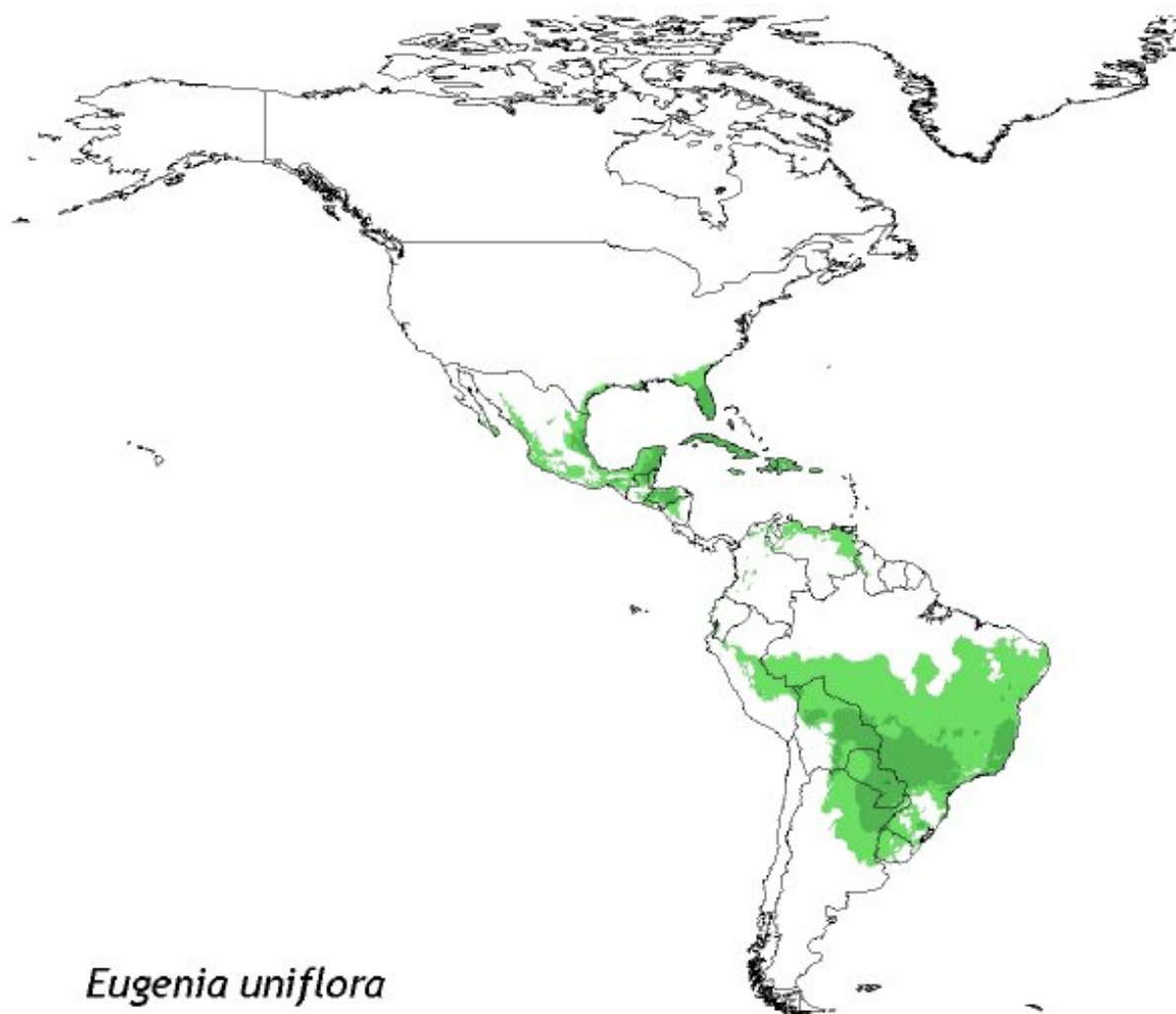
2.4. Farmacogeografía

La planta es nativa de Surinam, Guyana y Guyana Francesa, se encuentra al sudeste de Brasil (especialmente en los estados de Río de Janeiro, Paraña, Santa Catarina y Río Grande do Sul) y al norte, este y centro de Uruguay.

Como malezas, crece extensamente en las riveras del Río Pilcomayo en el Paraguay.

La primera descripción botánica proviene de una planta cultivada en un jardín en Pisa, Italia, la cual se piensa que ha sido introducida desde Goa, India. Viajeros portugueses han dicho que han transportado la semilla desde Brasil a India. Es naturalizada en Argentina, Venezuela y Colombia, también a lo largo de la costa atlántica de América Central; y en algunas zonas de la India occidentales, las Islas Cayman, Jamaica, St. Tomas, St. Craix, Puerto Rico, Cuba, Haití, República Dominicana, en las Bahamas y Bermuda. Su difusión se debe a que se cultivo particularmente por sus frutos. (Morton, J. (1987).

Mapa con distribución geográfica de *Eugenia uniflora*



http://www.ipgri.cgiar.org/Regions/Americas/programmes/TropicalFruits/images/eugenia_uniflora_p.jpg

2.5. Usos etnofarmacológicos

En Brasil la infusión de hojas es tomada como estomáquico, febrífugo, antitusivos, antigripal y astringente.

En Surinam, la decocción de hojas es bebida como un remedio frío, combinado con lemongrass, es usado como febrífugo. (Morton, J. 1987).

En el noreste de Argentina las hojas son usadas en infusiones, solas o mezcladas con “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae) como un agente antihipertensivo en medicina folclórica, también en el tratamiento de desordenes digestivos.

En las regiones adyacentes a Paraguay las hojas son consideradas por sus propiedades diuréticas y antiinflamatorias. (Consolini y col. 1999)

Infusiones o decocciones hechas de las hojas de *Eugenia uniflora* L. son usadas en medicina folklórica como antidiarreico, diurético, antirreumático, emenagogo, para reducir azúcar en sangre y grasas. (Arai y col 1999).

Otros usos de las hojas en infusión son: como eupéptico, carminativo, y para disminuir los niveles de colesterol en sangre, controlar los niveles de ácido úrico, reducir el peso y la presión sanguínea. (Schopoval, y col. 1994).

Las decocciones de hojas también suelen utilizarse a nivel popular para infecciones del aparato urinario. (Perez, Anesini, 1994).

2.6. Antecedentes farmacológicos

Debido a su utilización en medicina folclórica para diabetes y obesidad, el extracto etanólico de sus hojas fue investigado con pruebas de carbohidratos y de tolerancia grasa comprobando que **inhibe la degradación de grasas y carbohidratos** en intestino de ratón. (Arai y col 1999).

La actividad **anti-inflamatoria** de *Eugenia uniflora* fue observada cuando extractos de hojas frescas fueron administradas por vía oral a las ratas y más intensamente bajo la forma de infusión. El hecho fue relacionado con la presencia de sustancias volátiles las cuales pueden sufrir alteraciones durante el tiempo empleado en el secado o extracción, incluso a temperatura ambiente. Los extractos activos demostraron un alto porcentaje de inhibición durante las primeras 2 hs. de tratamiento,. (Schopoval, y col., 1994)

Se ha encontrado que los flavonoides presentes en las infusiones y decocciones de hojas tienen propiedades inhibitorias de xantina-oxidasa, lo que posiblemente justificaría su uso en el tratamiento de **la gota**. (Schmeda Hirschmanny col., 1987).

Entre los numerosos estudios realizados, la infusión de hojas de *Eugenia uniflora* produjo **un importante incremento en tiempo de sueño** de pentobarbital. Esto puede ser relacionado a la composición química, especialmente monoterpenos los cuales podrán interferir con la distribución en el SNC (Sistema Nervioso Central) del pentobarbital. Los monoterpenos son naturalmente inductores del citocromo P-450 dependiente de las enzimas las cuales forman parte de la biotransformación del pentobarbital. (Schopoval, y col. (1994)

Las hojas de *Eugenia uniflora* L. son ricas en aceites esenciales conteniendo citronelol, geraniol, cineol y sesquiterpenos (Kücker y col., 1977; Weyerstahl y col., 1988; Henriques y col., 1993) han sido

citados como posibles responsables de las actividades **antimicrobiana y antifúngica**. (Adebajo y col., 1989).

Posteriormente otros investigadores profundizaron con la investigación en actividades antimicrobianas analizando el aceite volátil de hojas y frutos de *Eugenia uniflora*, se investigó más uso en desórdenes intestinales e infecciones del tracto urinario, no demostrando resultados claramente definidos. Se pensó que los resultados positivos estaban posiblemente relacionados con la elección del tiempo de recolección, estación, estado de madurez de las hojas y frutos. El efecto antimicrobiano fue investigado en los extractos, que fueron preparados como infusión y decocción de hojas frescas al 5% en forma similar a la forma de uso popular. Todos los microorganismos testados: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, fueron resistentes cuando fueron ensayados por difusión en placas con gel de agar. (Schapoval, y col. 1994)

El uso de esta planta como **antidiarreico** se investigó realizando la evaluación del tránsito intestinal con carbón activado. Los resultados obtenidos fueron importantes cuando el método de extracción fue la decocción de hojas, sugiriendo que este método puede ser más efectivo para la extracción de taninos, metabolitos que están presentes en la especie en grandes cantidades. (Schopoval, y col.1994).El efecto antidiarreico del extracto acuoso fue confirmado por su uso popular. (Almeida C. E., y col. 1995)

Otros investigadores utilizaron preparaciones “in situ” para evaluar el **tono vascular** (Consolini y Grand, 1991). Estas tienen la ventaja de mostrar la respuesta total arterial y venosa a un agente fluctuoso dentro de la vía de perfusión normal.

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *E. uniflora* y sus fracciones mostraron un efecto vasorelajante sobre la aorta torácica en ratas. (Wazlawik, E., col 1997)

Los extractos acuosos crudos (EAC) de *Eugenia uniflora* L.

demonstraron una gran actividad **hipotensora** en ratas anestesiadas normotensas. La presión sanguínea es determinada por resistencia periférica, sus efectos farmacológicos fueron examinados entre factores tales como innervación adrenérgica de vasos y tono contráctil de la musculatura lisa vascular. Los EAC de *Eugenia uniflora* L. actuarían con la contracción de vasos en alguna vía diferente del receptor adrenérgico α_1 . (Consolini, y col. 1999)

Se evaluaron los efectos de EAC en el cuarto trasero de rata perfundido arterialmente previamente contraído, la vasodilatación producida por EAC de *Eugenia uniflora* L. en la fase tónica sugiere un efecto directo en la musculatura lisa vascular, tal como bloqueo de canales de calcio, activación de canales de K o inhibición de fosfodiesterasa. (Consolini, y col. 1999) Los estudios sobre el tema fueron profundizados por un efecto dual relacionado con su actividad hipotensora (Consolini y Sarubbio 2002)

Extracto crudo de *Eugenia uniflora* L. a dosis de 120 mg. d.l. /Kg. fue casi tan potente como amilorida 20 mg/Kg. comparando sus relaciones en **actividad diurética** absoluta; pero difirieron en los efectos iónico urinario. (Consolini, y col. 1999).

Cuatro taninos aislados de *Eugenia uniflora* mostraron un efecto inhibitorio de ADN polimerasa del **virus Epstein-Barr** relacionado con el carcinoma nasofaríngeo. (Lee MH₂ y col. 2000).

En cuanto a **genotoxicidad** del extracto acuoso de hojas de *Eugenia uniflora* L. se comprobó que no tiene efectos genotóxicos significativos o efecto clastogénicos (que producen lesiones en las cadenas de ADN) cuando es bioensayado el test *Allium cepa* en la primera hilera (Yajía y col., 1997).

El extracto metanólico fue estudiado junto a otros extractos de diferentes especies usadas en la medicina tradicional de Paraguay, encontrando un gran **efecto antioxidante**. (Velásquez E y col. 2003)

Estudios del aceite esencial demostraron que el mismo presentaba una **actividad citotóxica** potente, y variada actividad antimicrobiana (Ogunwanden y col. 2005).

Fueron estudiados los extractos de *Eugenia uniflora* frente *Trypanosoma congolense* y *T. brucei*, observándose una potencial actividad **tripanocida**. (Adewunmi y col. 2001).

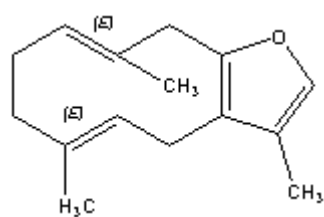
2.7. Antecedentes fitoquímicos

A manera de resumen, en la siguiente tabla se muestra los antecedentes fitoquímicos con los constituyentes del aceite esencial obtenido de hojas de *Eugenia uniflora*., realizados conjuntamente por investigadores de Berlín y Nigeria (Weyerstahl, y col. 1988).

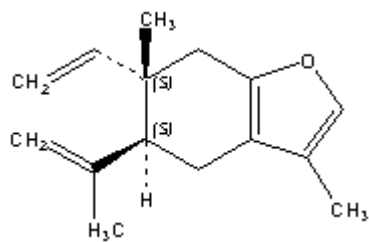
En su mayoría monoterpenos y sesquiterpenos, encontrando nuevas estructuras en estos últimos.

Nº	Compuesto
4	mirceno
5	α -felandreno
6	3- careno
7	α -terpineno
8	<i>p</i> - cimeno
9 _a	<i>cis</i> -ocimeno
9 _b	Limoneno
10	<i>trans</i> -ocimeno
11	γ -terpineno
12	α - <i>p</i> -dimetilestireno
13	linalol
14	terpinoleno
16	Metil geraniol
17	δ -elemeno
19	β -elemeno
20	cariofileno
21	γ -elemeno
23	humuleno
24	<i>allo</i> -aromadendreno

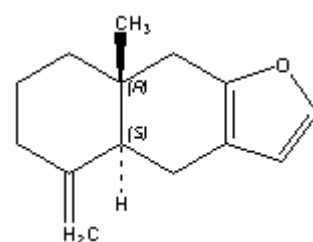
26	germacreno D
27 _a	furanodieno
27 _b	furanoelemeno
28 _a	biciclogermacreno
28 _b	β-selineno
29	ledeno
33	germacreno B
34 _a	espatulenol
34 _b	globulol
35 _a	viridiflorol
35 _b	(<i>E,E</i>)-germacrano
36	Selina-1.3,7(11)- trien-8-ona
37	Selin—11-en-4α-ol
40	Rearrangement product of 27 _{ab} . 35 _b .
41	oxidoselina- 1.3.7(11)-trien-8- ona
44	4-acetoxigermacra- 1.8(11)-dien-9-ona



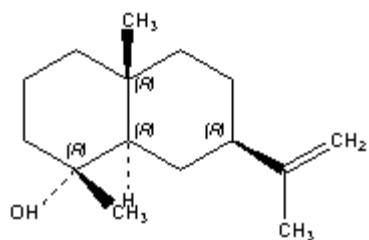
27_a



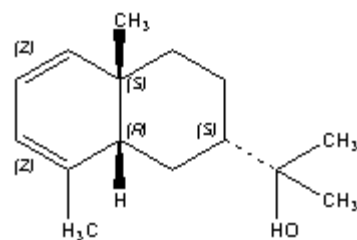
27_b



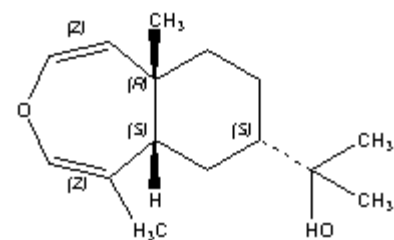
27_c



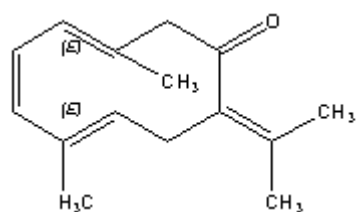
37



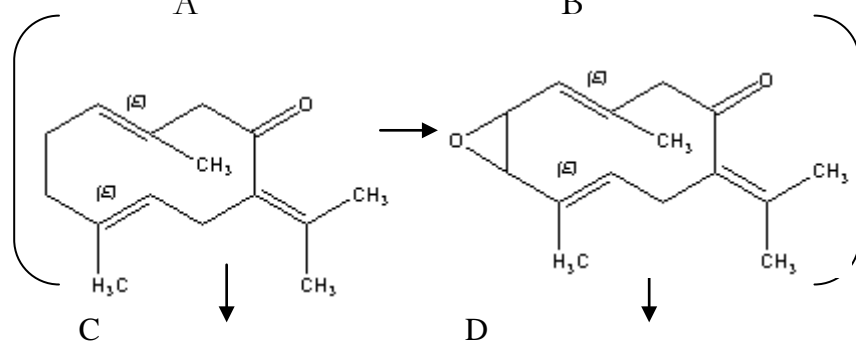
A



B

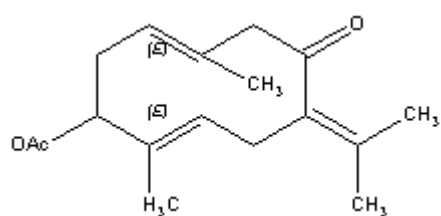


35_b

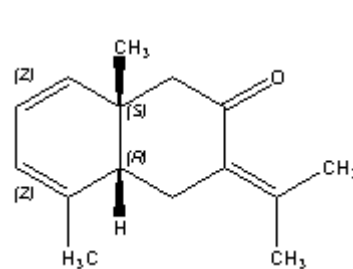


C

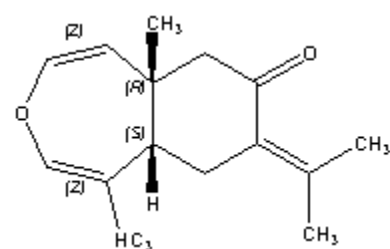
D



44



36

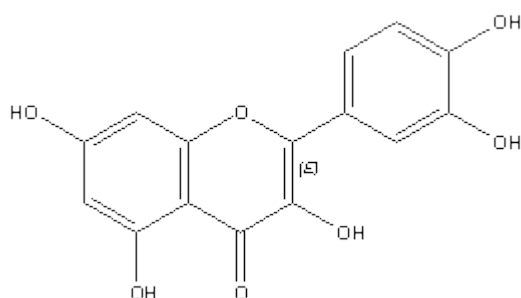


41

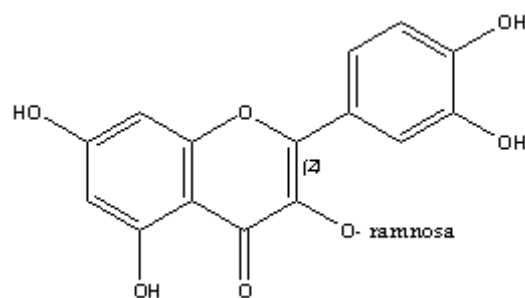
Haciendo referencia a trabajos de investigación sobre compuestos fitoquímicos de *Eugenia uniflora* se puede decir que en Francia (Kanazawa, y col. 2000) lograron sintetizar eficientemente el compuesto que se encuentra en mayor proporción en el aceite esencial de *Eugenia uniflora*.: Selina-1, 3,7(11)-trien-8-one(36) y se comprobó su actividad antimicrobiana contra bacteria Gram -positiva *Sarcina lutea* y *Mycobacterium phlei* y también se hizo referencia a su actividad antifúngica *Cándida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Polifenoles aislados de *Eugenia uniflora*

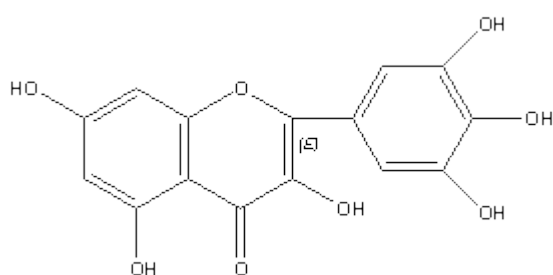
Estudios realizados en la búsqueda de nuevos compuestos para tratar la enfermedad de la gota demostraron que flavonoides de naturaleza química reconocida, aislados del extracto de esta planta, eran los responsables de la actividad inhibitoria de xantinoxidasa ellos son: Quercetina, quercitrina, miricetina, miricetrina. (Schemeda-Hirschmann, y col., 1987)



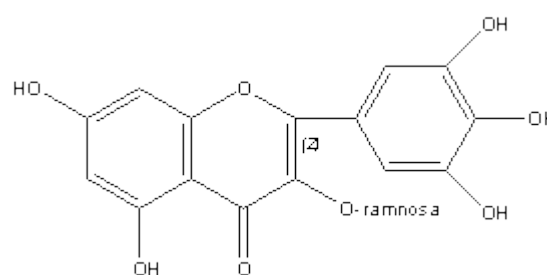
Quercetina



Quecitrina



Miricetina

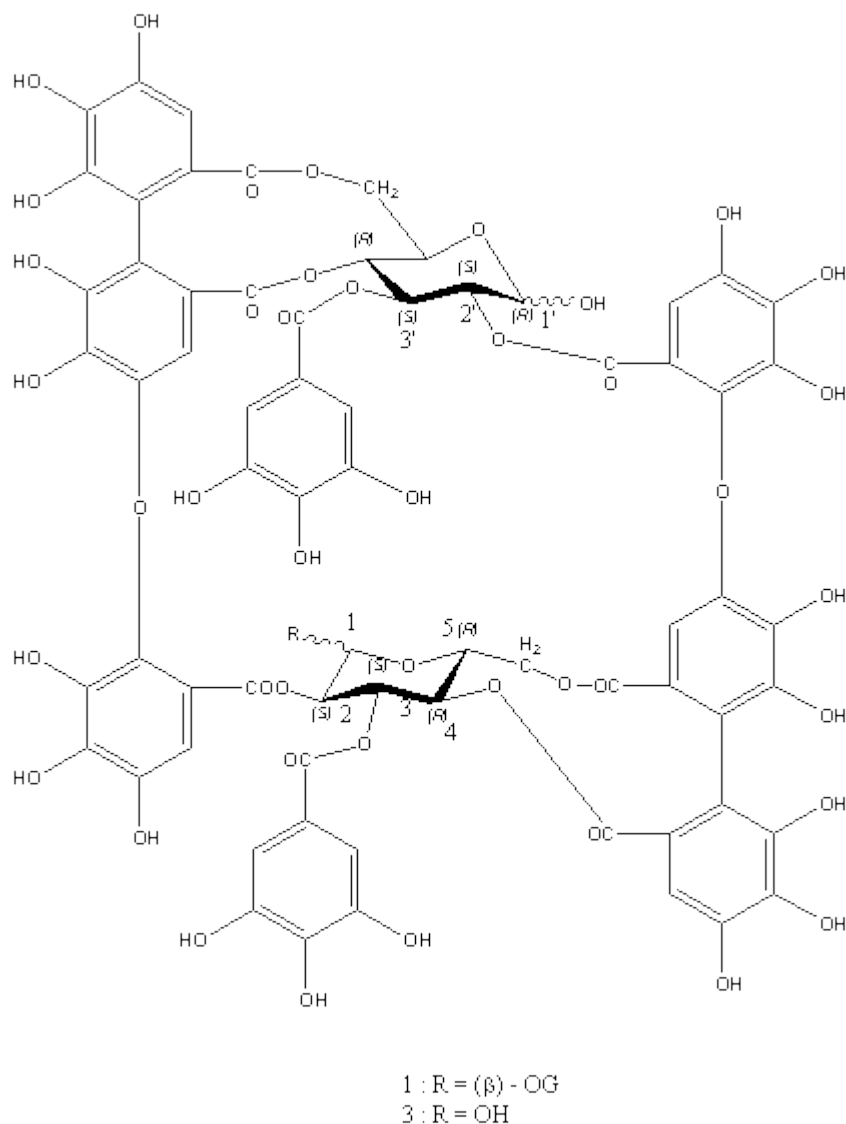


Miricetrina

La presencia de miricetina en el género *Eugenia* (Mirtaceae) como también de procianidina y prodelfidina y ausencias de flavonas en las especies indicó quimiotaxonomicamente la pertenencia a una familia

primitiva. (Haron y col. 1992)

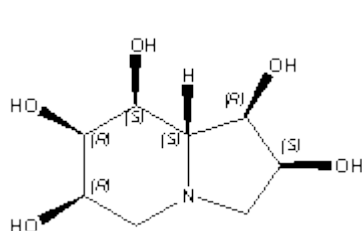
Es sabido que la familia Mirtaceae es rica en polifenoles, en 1996 un grupo de investigadores en Japón aisló de las hojas de *Eugenia uniflora* seis compuestos fenólicos incluyendo Oenothin B compuesto anteriormente encontrados en especies de *Oenothera*, los cuales habrían tenidos buenos resultados en cáncer de mama en ratones y también fueron encontrados: 1,2,4,6-tetra-o-galoil-b-D-



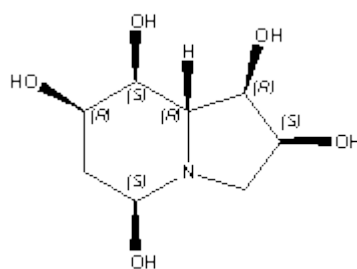
glucosa, miricetrina, galocatequina y dos nuevos compuestos dimeros, taninos macrocíclicos hidrolizables nombrados como Eugeniflorins D₁ y D₂.(1:3) (Lee, y col. 1997)

Investigaciones posteriores han aislado nuevos compuestos del extracto acuoso de las hojas de *Eugenia uniflora*, los cuales se hallaban en la fracción activa como inhibitoria del incremento de azúcar en plasma, se llaman *Uniflorines- A* (1) y *B* (2) y se identificó un nuevo compuesto:

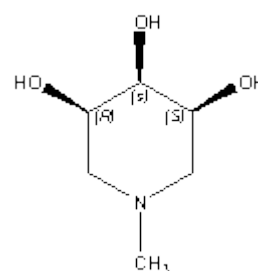
(+)- (3 α , 4 α , 5 β)-1-methylpiperidine-3, 4, 5,-triol (3).



1



2



3

Estos estudios trataron de justificar el uso de *Eugenia uniflora* como antidiabético y fueron realizados por investigadores en Japón (Matsumura y col., 2000)

2.8. Selección de la especie

La selección de *Eugenia uniflora* se realizó teniendo en cuenta aspectos; quimiotaxonómico-filogenético

Distintas especies del género *Eugenia* han sido estudiadas por su importancia, demostrando tener diferentes actividades desde el punto de vista farmacológico. Algunos ejemplos de lo dicho anteriormente son:

Eugenia jambolana de la cual se estudió el extracto etanólico, encontrando actividad antidiarreica con disminución de la motilidad gastrointestinal (Mukherjee y col., 1998).

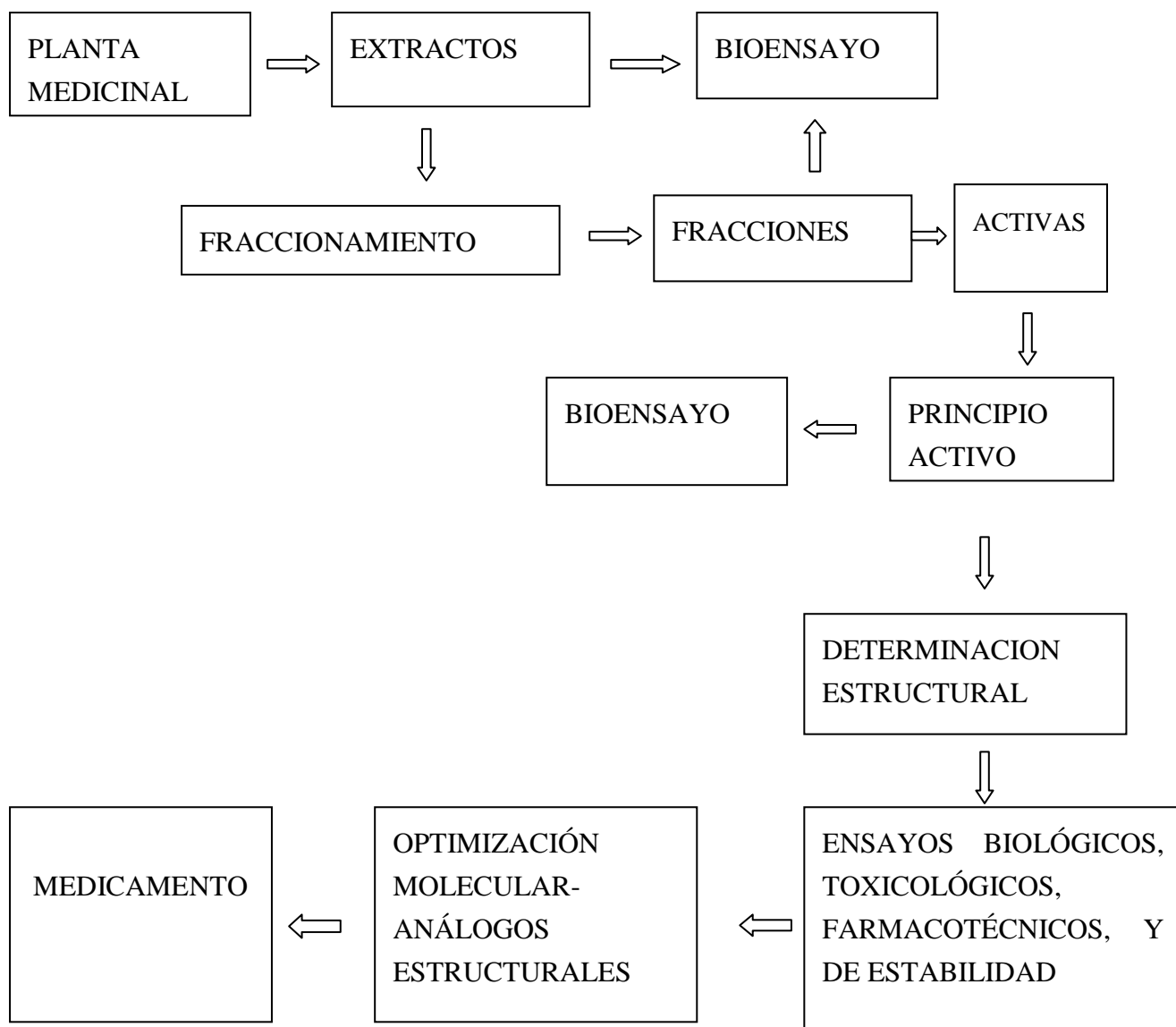
Eugenia caryophyllata su estudio se llevó a cabo en lo referido a su aceite esencial, encontrándose actividad en ensayo biológico como antiepiléptico, anti-electroshock y PTZ, avalando el uso que tenía en medicina folclórica con el mismo fin. (Pourgholami, 1999.).

Eugenia uniflora sus numerosos usos como antidiarréico, antirreumático, (Wazlawik y col., 1997) diurético, antifebril (Schapoval, y col 1994) en infusiones y su estudio en decocción como hipotensora y diurética (Consolini y col. 1999), y en extracto hidroalcohólico se comprobó su actividad vasorrelajante (Consolini y col. 2002). También se corroboró que inhibe el metabolismo lipídico y glucídico en intestino (Schemeda-Hirschmann, 1987) este tema también fue investigado posteriormente por otros autores (Arai l. y col. 1999).

El estudio comenzó con la búsqueda de actividad antiepiléptica debido a la proximidad taxonómica con *Eugenia caryophyllata*.

3. Obtención de Medicamentos a partir de una planta medicinal

Esquema general de obtención de medicamentos a partir de planta medicinal

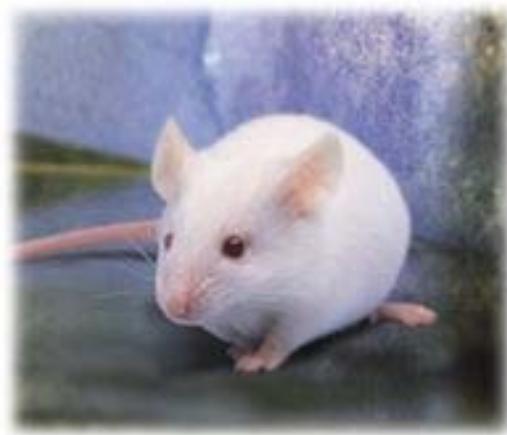


4. Ensayos farmacológicos

En el ensayo farmacológico se tiene en cuenta los requisitos específicos: tipo de actividad, cantidad de muestra, selectividad, sensibilidad del método y costos. Los ensayos pueden ser *in vitro* o *in vivo*. En nuestro caso se optó por la segunda opción, trabajando con animales vivos, siendo una herramienta necesaria para la búsqueda de nuevos principios activos dada características de la actividad buscada, actividad anticonvulsiva orientada a reproducir la situación patológica por tal motivo se siguió el procedimiento del NIH(Programa del National Institute of Health) .

Al trabajar *in vivo* intervienen otros factores como farmacocinética, estabilidad, etc., que se deben luego extrapolar al llevar el empleo a seres humano. (Villar del Fresno, A., 1999)

Se tiene en cuenta que el uso de animales pieza fundamental en la investigación, solamente se acepta si el mismo colabora en forma efectiva a mejorar la comprensión de principios biológicos fundamentales, o al desarrollo de conocimientos que luego beneficiaran a los seres humanos.



Ratón albino de laboratorio

<http://img185.imageshack.us/img185/8427/ratonkd5.jpg>.

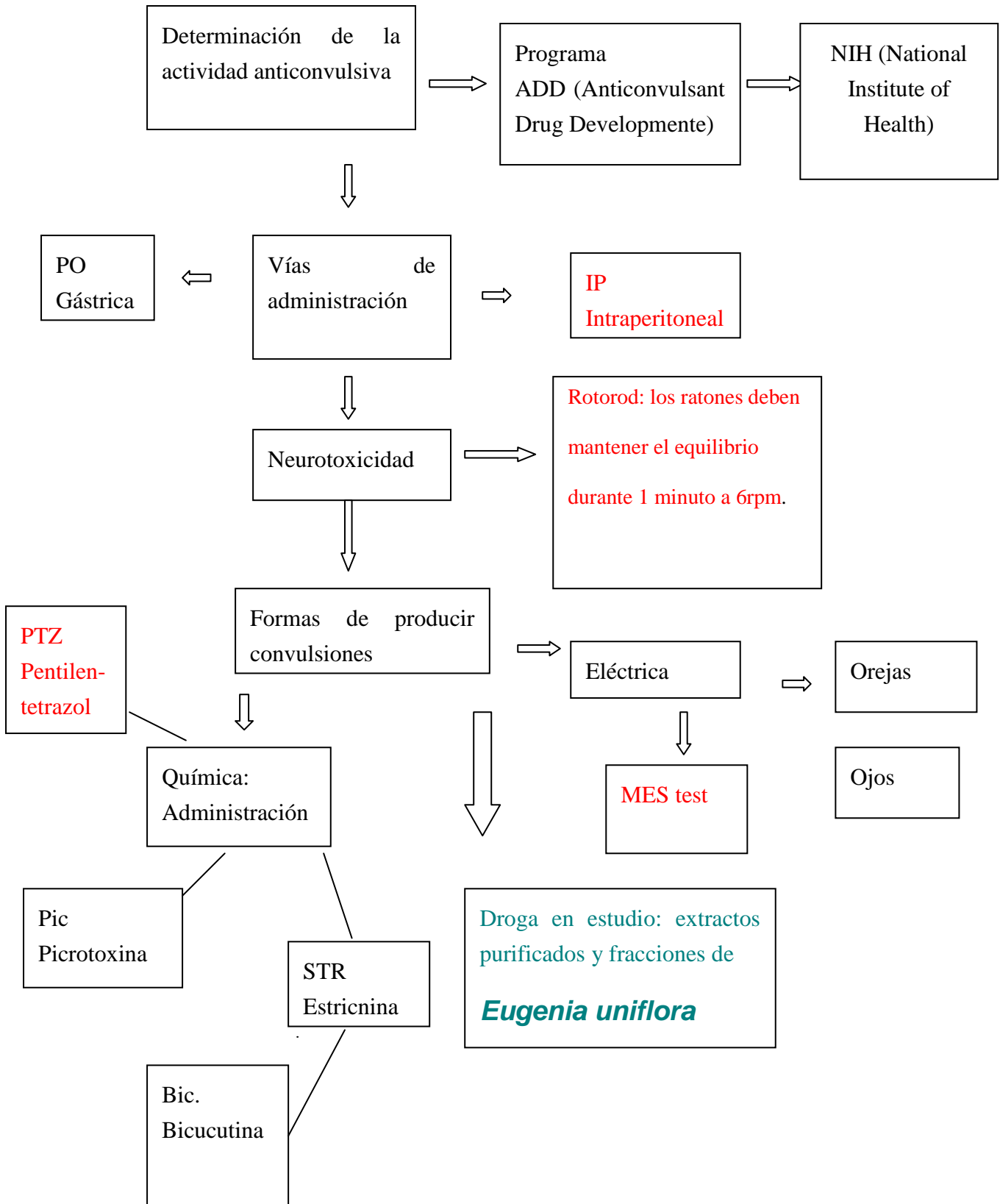
4.1. Ensayos anticonvulsivantes

Una convulsión se produce cuando en una o varias zonas del cerebro ocurren una descarga de señales eléctricas anormales que interrumpe temporalmente la función eléctrica normal del mismo, es un trastorno de la conducta ocurrido por la activación desordenada, sincrónica y rítmica de las neuronas cerebrales.

En la epilepsia existe un trastorno de la función cerebral, caracterizado generalmente por el surgimiento de convulsiones, una descarga neuronal localizada en un área específica del cerebro, llamado foco primario o foco epileptógeno. El origen puede ser motor, sensitivo, psíquico o autonómico., puede existir o no pérdida de la conciencia.

Teniendo en cuenta la población que posee esta enfermedad, y la presencia en el género *Eugenia* de actividad anticonvulsiva, se buscó un potencial anticonvulsivante en los extractos y fracciones obtenidos de *Eugenia uniflora.*, la evaluación se realizó como se esquematiza en la página siguiente.

Evaluación de la actividad anticonvulsiva en extractos de *Eugenia uniflora*



5. Objetivo

El objetivo de la presente investigación es el aislamiento y determinación de estructura química de principios activos presentes en *Eugenia uniflora*, centrado en los compuestos solubles en metanol y la evaluación de su actividad anticonvulsiva. Para ello se tuvo en cuenta la quimiotaxonomía en la búsqueda de principios activos, ya que se había encontrado esta actividad en *Eugenia caryophyllata* (Pourgholani, y col.. 1999)

En el interior de nuestro país, en la provincia de Misiones, es muy frecuente el consumo de esta hierba medicinal, la cual se ofrece en las calles, en ferias y se induce a su uso por comentarios de conocidos, de boca en boca. El uso está arraigado en el tiempo y por las costumbres.

El Dr. Aníbal G. Amat (1991) hizo una revisión de diferentes especies de la zona, usadas popularmente, informando su nombre vulgar, nombre científico, uso etnofarmacológico, parte del vegetal utilizada, y forma de utilización (infusión, cocimiento, etc.). Entre las especies recopiladas estaba “Pitanga” o “Ñangapiri”, interesante para un estudio fitoquímico, tal ese así que Bandoni y col. (1971) habían estudiado a *Eugenia uniflora* en un *Screening* fitoquímico de plantas medicinales argentinas de uso folclórico, donde se destacaba sus usos como astringente e hipotensor.

6. Materiales y métodos

6.1. Material vegetal: Procedencia

Las hojas de *Eugenia uniflora* fueron recolectadas en noviembre de 1999 en horas de la mañana, en bosques secundarios de Santa Ana Departamento de Candelaria, Provincia de Misiones, Argentina.

6.1.2. Determinación taxonómica

La determinación taxonómica y recolección fue realizada por el Profesor Doctor Aníbal G. Amat de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, NR 2581 (Herbario del departamento de Farmacia de dicha Facultad).

6.1.3. Procesamiento

El material vegetal fue secado a 40 °C en tambor de vacío hasta peso constante. Posteriormente se trituró mecánicamente a polvo fino en un molinillo Glen Creston (Stanmore England).

6.2. Extracción del material vegetal

6.2.1. Obtención del extracto Metanólico y Hexánico

250 g del polvo de las hojas desecadas de *Eugenia uniflora* fue extraído con hexano mediante maceración durante siete días usando agitación mecánico (shaker) , hasta agotar el material. El criterio seguido en la extracción para considerar el material agotado fue que el residuo evaporado de 10 ml de muestra filtrada, de la extracción, una vez seco su peso debía ser menor a 1 mg, si el peso era mayor se agregaba solvente nuevo sobre el marco de la extracción. En este caso

fue necesario hacer 4 extracciones de 1000 ml. Con la obtención del extracto metanólico se procedió de la misma manera.

Los extractivos fueron evaporados a presión reducida, en evaporador rotatorio, y secados en tambor de vacío hasta peso constante, obteniéndose los siguientes extractos

Extracto hexánico = 8.31g

Extracto metanólico = 11.52g

Nota: parte del extracto hexánico lo utilizó la Lic. Viviana Bravi como material para su tesis de Maestría en Plantas Medicinales

6.2.2. Obtención de Infusión y cocimiento

Con el objeto de evaluar las distintas actividades biológicas, en el presente trabajo se usaron infusión y cocimiento de una muestra del vegetal, para ello se siguieron los procedimientos de Farmacopea Argentina VI Edición.

Infusión: se pesaron 5 g de polvo de las hojas desecadas de *Eugenia uniflora* en un erlenmeyer, se añadió 100 ml de agua destilada hirviendo se tapó y se dejó actuar durante 20 minutos, se filtró por papel de filtro y se añadió cantidad suficiente de agua destilada hasta completar 100 ml totales.

Cocimiento: se pesaron 25 g de polvo de las hojas desecadas de *Eugenia uniflora* en un erlenmeyer con 500 ml de agua destilada, y se calentó hasta ebullición lenta durante 20 minutos, se dejó enfriar, y se filtró, con papel de filtro y se completó con agua destilada hasta completar 250 ml totales.

6.3. Análisis fitoquímico

Todos los solventes utilizados en el presente trabajo fueron de calidad analítica, y en el caso que fue necesario se procedió a su purificación, según técnicas descritas en la literatura y se le realizaron los controles para que cumpliera con dicha calidad.

6.3.1. Métodos cromatográficos utilizados

A-Cromatografía en papel, CP.

Fase estacionaria: Papel Watman N° 1

Fase móvil: Ácido acético al 5%.

Revelado: Luz UV 254 nm, luz UV 366 nm.

Reactivo revelador: Solución de cloruro férrico 2%.

B-Cromatografía en capa fina, TLC.

Fase estacionaria: Silica gel 60 F 254 Merk 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua destilada. (100:11:11:27).

Revelado: UV. 254 nm ,366 nm más vapores de amoníaco

C- Cromatografía en columna, CC.

Fase estacionaria: 20g de Sephadex LH 20

Fase móvil: metanol, metanol /agua destilada (9:1)

D- Cromatografía "Flash" (MPLC)

Fase estacionaria: Celulosa MN300 HR.

Fase móvil: Acetona., acetona: metanol y metanol: agua destilada (en diferentes proporciones)

E- Cromatografía líquida de alta resolución, (HPLC).

Columna HYPERSYL ODS 12,5 x 4,6 mm de 5 μ m de tamaño de partícula promedio.

Solvente A : H₃PO₄ 0,02 M

Solvente B: Metanol.

Se hizo un gradiente lineal desde 90% a 10% de A y de 10 % a 90% de B en 35 minutos 1.000 ml/min

Se trabajó a temperatura ambiente con una presión de 1100 psi.

El detector fue fijado a una longitud de onda de 280 nm.

F- Cromatografía gaseosa CG acoplada a espectrometría de Masas. GC- MS

Columna capilar ultra-1

Fase móvil: Gas Helio P. Col.7 PSI

Longitud: 25 m

Diámetro. 0,20 mm

Espesor Film: 33 m μ

Detector usado: Masa

6.3.2. Técnicas de revelado

Los sistemas para detección empleados fueron: observación con luz visible, ultravioleta a 254 nm, y/o ultravioleta a 366 nm y la utilización de distintos reactivos reveladores destructivos y no destructivos.

6.3.3. Reactivos utilizados

Se prepararon según “Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel” E. MERK AG. DARMSTADT (1998)

- Cloruro de Aluminio para flavonoides

Solución etanólica al 1% de Cloruro de Aluminio

Se reveló el cromatograma por aspersion y se observó a la luz UV.

- Dragendorff (reactivo para alcaloides según Munier y Macheboeuf)

Solución A: Se disuelve 0,85 g de bismuto (III) nitrato básico en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua.

Solución B: Se disuelven 8 g de yoduro potásico en 20 ml de agua.

Solución pulverizable: se mezclan 5ml de la solución A y 5ml de la solución B y se añaden 20 ml de ácido acético glacial. La solución se completa con agua hasta 100 ml. Se reserva en heladera.

- Cloruro de Hierro (III) (para ácidos hidroxámicos y fenoles)

Solución pulverizable: Solución acuosa al 1% de Cloruro de hierro (III)

- Yodo (reactivo universal)

El cromatograma se coloca en un recipiente cerrado, en cuyo fondo se encuentran algunos granos pequeños de yodo sublimado que han saturado la atmosfera del recipiente que los contienen, transcurridos 15 minutos o más, se observan las manchas de los productos de tonalidades amarillo y/o marrón.

- Hidróxido de Potasio (para cumarinas y flavonoides)

Solución de hidróxido de potasio al 1% en alcohol etílico 96°.

Los cromatogramas pulverizados y secados en la estufa se observan a la luz UV 366nm.

- Ácido fosfomolibdico (reactivo para compuestos reductores)

Solución recién preparada de 5 g de ácido fosfomolibdico en 100 ml de alcohol etílico 96°. Pulverizar y calentar 5 minutos a 80 - 90°C

- Reactivo de ninhidrina (para aminoácidos y aminas biógenas)

Disolver 30 mg de ninhidrina en 10 ml de N.butanol más 0,3 ml de Ácido acético 98%. Después de sprayar (8-10 ml) la placa se calienta 5- 10 minutos bajo observación y evaluación en el visible. (Wagner 1996).

- Reactivo de RPN (Reactivo de Productos Naturales, para flavonoides y polifenoles en general)

Disolver 1g del ester del ácido 2- amino etil difenil bórico (AEDBE) en 100 ml de metanol, pulverizar y observar al visible y a la luz UV 366 nm

6.3.4. Fraccionamiento del extracto metanólico

El extracto metanólico concentrado en rotavapor y secado a peso de 11 g en tambor de secado al vacío a temperatura ambiente, fue disuelto en 100 ml de etanol usando ultrasonido, se dejó a temperatura ambiente, durante 48 horas, luego en heladera y por último en freezer.

El precipitado formado se separó por centrifugación, 5 minutos a 5000 rpm a 0° C, se extrajo la fase líquida con pipeta pasteur. La fase sólida se rotuló FIIa

Se agregó etanol a la fase líquida, sobrenadante, (al extracto etanólico aguas madres), se centrifugó, el precipitado obtenido se rotula FIIb y se reúne con FIIa resultando FII= -9.38g.

El precipitado FII obtenido disuelto en metanol, el sobrenadante y el extracto metanólico inicial fueron sometidos a las siguientes reacciones de caracte- rización simultaneamente.

6.3.5. Reacciones de caracterización

- REACCIÓN DE SHINODA (PARA FLAVONOIDES)

Se colocó 1ml de la solución a investigar, en un tubo de ensayo se agregó unas granallas de Mg y 0.5 ml de ácido clorhídrico, cuando se enfrió se agregó 0.5 ml de alcohol amílico mas 2ml de agua destilada, se agitó y se dejó en reposo. Se observó la formación de color rojo, en fase orgánica indicando presencia de flavonoides.

- REACCION CON CLORURO FERRICO (para ácidos hidroxámicos y fenoles)

Se colocó 0.5 ml de la solución a investigar en un tubo de ensayo, agregando dos gotas de solución acuosa de tricloruro férrico al 1%. Se observó la coloración azul verdosa resultante.

- REACCION DE FEHLING DIRECTA

Preparación del Licor de Fehling (reactivo para compuestos reductores)

Solución cupritartárica alcalina valorada, 4,36g de SO_4Cu , 5 H_2O en 100 mililitros de agua destilada

Solución A. de sulfato de cobre: En un matraz aforado de 50 ml se colocan 3,5 g de sulfato de cobre cristalizado, se agregan 15 ml de agua destilada y se calienta a baño María (BM), para disolver. Enfriar, se agrega 0.5ml de ácido sulfúrico, enfriar y diluir con agua destilada hasta completar el volumen de 50 ml

Solución B, de tartrato alcalino: en una cápsula de porcelana, se disuelven en BM 17,3 g de tartrato de sodio y potasio cristalizado y 5 g de hidróxido de sodio, en 40 ml de agua destilada. Enfriar y completar a volumen de 500 ml con cantidad suficiente de agua destilada. Para su empleo, se mezclan volúmenes exactamente iguales de las dos soluciones. (FNA VI Ed. 1978)

Se colocó 1 ml del extracto en un tubo de ensayo se agregó 1 ml de reactivo de Fehling se calentó a ebullición. Se observó formación color rojo ladrillo.

- REACCION DE FEHLING INDIRECTA

Se colocó 1 ml del extracto en un tubo de ensayo se agregó 0.5 ml de SO_4H_2 concentrado, se calentó a ebullición durante unos minutos, se enfrió y agregó NaOH concentrado hasta reacción alcalina al tornasol, se agregó igual volumen de reactivo de Fehling y se llevó a ebullición. En frío se observó rojo ladrillo y se anotó los resultados.

- REACCIÓN CON GELATINA AL 1%. PARA TANINOS

Se preparó una solución de gelatina al 1% que además contenía NaCl (10 %).

Sobre alícuota de 1 ml de esta solución se agregó 1 ml de la solución a investigar observando la aparición de precipitado.

6.3.6. Cromatografía en capa fina

Fase estacionaria: Silica gel 60 F 254 Merk 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua destilada. (100:11:11:27).

Siembra: M: extracto metanólico de *Eugenia uniflora* (redisuelto en metanol, 1 mg/0.1 ml)

FI + FII

FI: sobrenadante

FII: precipitado

Tiempo de corrida: aproximadamente 1 hora.

Revelado: UV. 254 nm ,366 nm más vapores de amoníaco

Extracción del precipitado FII con éter de petróleo

Posteriormente el precipitado FII fue lavado con hexano tres veces con 20 ml cada vez, centrifugando antes de cada separación de las fases. Posteriormente se hicieron tres extracciones del precipitado FII usando como solvente de extracción metanol saturado con éter de petróleo centrifugando antes de cada separación de las fases, se concentró en rotavapor y se secó en tambor de vacío hasta peso constante.

Así se obtuvo:

FIIA: insoluble metanol/éter de petróleo = 5,07g

FIIIB: extracto metanol /éter de petróleo = 3,70 g

6.3.7. Cromatografía en columna FII A

La fracción de mayor actividad según los resultados obtenidos en los ensayos farmacológicos fue FIIA según procedimientos expuestos en los mismos. Se continuó con procedimiento de purificación mediante cromatografía en columna de la fracción FIIA

Columna: long. 26 cm y 3cm de diámetro

Fase estacionaria: 20g de Sephadex LH 20

Fase móvil: metanol, metanol /agua destilada (9:1)

Siembra: 4 g de FII A se disolvieron con 8ml de metanol mas 3ml de agua destilada con 2,5ml de dimetilsulfóxido usando ultrasonido y luego centrifugando, sembrándose solo el sobrenadante).

Se recolectaron 40 fracciones de 10 ml cada una. Fueron examinadas mediante TLC en distintos sistemas cromatográficos.

1- Fase estacionaria: Silicagel HF 254, Fase móvil: metanol.

2- Fase estacionaria: Silicagel HF 254, Fase móvil: metanol/ diclorometano (4:1).

3-Fase estacionaria: Silicagel HF 254, Fase móvil: Acetato de etilo/ácido acético/ácido fórmico/ agua destilada (100:11:11:26).

Revelado: Luz UV254, UV366, Rvo. Sulfomolibdico y reactivo de AEDBE.

Se reunieron las fracciones que presentaron semejante perfil cromatográfico, fueron evaluadas biológicamente, determinándose que la Fr IIA 9-15 resultó activa en el ensayo de actividad anticonvulsiva.

Purificación de la Fr IIA 9-15

La fracción Fr IIA 9-15 mostró un precipitado, fue centrifugada obteniéndose un precipitado P y un sobrenadante S

6.3.8. Cromatografía descendente en papel

Siembra, FI = sobrenadante, S sólido = FII

Sustancia de referencia: G = Ácido Gálico, 1 mg/ml de metanol

Fase estacionaria: Papel Watman N° 1

Fase móvil: Ácido acético al 5%.

Revelado: Luz UV 254 nm, luz UV 366 nm.

Reactivo revelador: Solución de cloruro férrico 2%.

6.3.9. Cromatografía en columna con celulosa

Técnica: cromatografía en columna usando cromatógrafo

CombiFlash™ Sm 50 System.

Presión 2 atm Flujo 4 izquierda.

Preparación de la muestra: 3 g. de la muestra P, 10 ml de metanol, 2ml de agua destilada, y 10 g de celulosa se llevaron a rotavapor para secar y homogeneizar

Fase estacionaria: Celulosa MN300 HR.

Fase móvil: Acetona., acetona: metanol y metanol: agua destilada (en diferentes proporciones)

Se recolectaron 490 fracciones de 10 ml. Las fracciones fueron examinadas por TLC en los siguientes sistemas cromatográficos:

1-Fase estacionaria Celulosa, Fase móvil metanol.

2-Fase estacionaria: Silicagel F 254, Fase móvil: Acetato de etilo/ ácido acético/ ácido fórmico/ agua destilada (100:11:11:26)

3-Fase estacionaria: Silicagel F 254, Fase móvil Metanol: diclorometano (7:1)

4-Fase estacionaria: Celulosa, fase móvil: butanol/ ácido acético/ agua. (35:35:20:10).

Revelado: Luz UV254, UV366, Rvo. Ninhidrina y reactivo de AEDBE.

La fracciones 4 y 1 fueron cromatografiadas en el sistema 2 y

utilizando Fase estacionaria: celulosa y Fase móvil ácido acético al 15% ó ácido clorhídrico 1 N, contra estándar de ácido clorogénico 1mg/ml en metanol.

6.3.10. Cromatografía gaseosa-Espectro-metría de masa

Realizado por UMYMFOR (unidad de Microanálisis y Métodos Físicos de Química Orgánica- FCE y N-UBA-CONICET)

6.3.10.1. Análisis del precipitado P

Se entregaron para el análisis muestras obtenidas del precipitado P, las fracciones F1= 12 mg/ 0.2 ml de metanol y F4= 13,3 mg/0.5 ml de metanol

Estas fracciones se sometieron a un análisis por cromatografía gaseosa.

Instrumento: TRIO-2 VG MASSLAB

Modelo N° U03-200804/805

Temperatura inicial 240 °C.

Columna capilar ultra-1

Condiciones cromatográficas:

Fase móvil: Gas Helio P. Col.7 PSI

Longitud: 25 m

Diámetro. 0,20 mm

Espesor Film: 33 mμ

Temperatura máxima: 290 °C.

Se trabajó a flujo constante

Velocidad promedio: 39 cm/seg

Volumen inyectado: 1 μl

Detector usado: Masa

6.3.10.2. Análisis de la fracción S

Realizado por el Centro de Capacitación Analítica Dir. Dr. Ricardo Rofi.

Esta fracción se sometió a un análisis por cromatografía gaseosa utilizando método HP 6890

Modelo N° HP 19091S-433.

Temperatura inicial 250 °C

Columna capilar.

Fase móvil: Gas Helio

Fase estacionaria: Hp-5MS 5% Phenyl methyl Siloxane

Longitud: 30.0m

Diámetro: 250.00 µm

Espesor: 0.25 µm

Temperatura máxima: 325°C.

Se trabajó a flujo constante

Flujo inicial 1.1ml/min

Presión inicial: 10.61 psi

Velocidad promedio: 39 cm/seg

Volumen inyectado: 1 µl.

Inyector usado: manual.

Detector usado: Masa

6.3.11. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Columna

En cromatografía líquida de alta resolución fue usada una columna HYPERSYL ODS 12,5 x 4,6 mm de 5 μ m de tamaño de partícula promedio.

Fase móvil

Los solventes utilizados fueron de calidad analítica HPLC la fase móvil se filtró por filtro Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro y desgasificado con ultrasonido primero y burbujeo de gas Helio después, a temperatura ambiente.

Solvente A: H_3PO_4 0,02 M

Solvente B: Metanol.

Se hizo un gradiente lineal desde 90% a 10% de A y de 10 % a 90% de B en 35 minutos 1.000 ml/min

Se trabajó a temperatura ambiente con una presión de 1100 psi.

Detección

El detector fue fijado a una longitud de onda de 280 nm.

Muestra

Se inyectó 20 μ l de la fracción S de FIIA 9-15.

7. Ensayos de actividad biológica

El material utilizado en las evaluaciones biológicas fueron las hojas desecadas de *Eugenia uniflora* acondicionadas y sometidas a sucesivas extracciones según lo expresado en Extracción del Material Vegetal (Pág 66).

7.1. Materiales y método

Los extractos metanólico, hexánico, la infusión y el cocimiento fueron evaluados de acuerdo al Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program del National Institute of Health (Stables, J.P y col. 1989)

Se usaron fármacos de control, como ácido valproico, fenitoína, valpromida, y pentilentetrazol. Dichos compuestos y los extractos de *Eugenia uniflora* fueron administrados como soluciones homogéneas usando polietilenglicol (PEG) 400, al 30 % en un volumen 10 ml/kg.

Grupo control: fue ensayado un grupo control en cada evaluación, al cual se le administró solución fisiológica con los excipientes usados en la preparación de las muestras anticonvulsivas PEG 400. Se utilizaron grupos de entre 4 a 8 animales, ratones albinos de ambos sexos de 18-23 g de peso corporal, de 4 a 7 semanas de vida, mantenidos en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo (12 hs luz y 12 hs oscuridad) y con libre acceso a agua y alimento. Los animales fueron manejados según las recomendaciones de la guía para cuidado y el uso de animales de laboratorio (NIH 1996). Fueron provistos por el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP.

La administración de las muestras a ensayar fue intraperitoneal (ip). Se realizaron los test basados en la convulsión por electroshock (MES), convulsión inducida químicamente por pentilentetrazol (PTZ) sc (subcutáneo) y el test del rotorod para determinar neurotoxicidad.

7.2. Evaluación de actividad anticonvulsiva en *Eugenia uniflora*

Con el objeto de caracterizar biológicamente los distintos extractos de *Eugenia uniflora*, en su actividad anticonvulsiva, estos fueron evaluados de acuerdo al Anticonvulsant Drug Development (ADD) Programa del National Instituto Nacional de Salud de USA (NIH 1996). La evaluación de la actividad biológica realizada incluyó los extractos metanólico, hexánico, la infusión y el cocimiento.

7. 2.1. Inducción química de la convulsión

El pentilentetrazol fue disuelto en solución de Cloruro de Sodio 0.9% en dosis de 85 mg/Kg mínima necesaria para inducir convulsión tónico-clónica, se inyectó sc. en la parte posterior del cuello del animal. El proconvulsivo químico fue administrado en 10 ml/kg. Los ratones fueron observados posteriormente durante por lo menos 30 minutos para observar la presencia o ausencia de convulsión persistente en 5 segundos.

La ausencia de convulsión clónica indica protección. Esta prueba es usada para detectar las drogas que elevan el umbral mínimo de la convulsión.

7.2.2. Inducción física de la convulsión (electroshock (MES))

La convulsión fue inducida por un shock eléctrico (50 mA, 60 Hz durante 0,2 segundos) en los ratones utilizando electrodos de orejas, adicionados de una solución electrolítica de cloruro de sodio para asegurar una buena conducción eléctrica. Se cuantifica la extensión de los miembros traseros del animal. Se considera convulsión clónica, cuando la extensión de los miembros traseros del animal (ratón o

rata) no excede el ángulo de 90 grados entre los miembros traseros y el plano del cuerpo. Se denomina extensión tónica, cuando supera los 90 grados. Cuando el compuesto suprime la convulsión tónica inducida por MES test, se interpreta que el mismo presenta actividad anticonvulsiva.

7.2.3. Neurotoxicidad

La prueba del rotorod se utiliza para determinar la neurotoxicidad mínima (dosis tóxica media TD_{50}). En esta prueba se utiliza un aparato construido especialmente, semejante a una rueda de ardilla, para ratones: rotorod que consiste en una barra elevada que rota a una velocidad constante. La neurotoxicidad fue definida como la dificultad para mantener el equilibrio en los ratones tratados IP por un minuto en la barra que rotaba a 6 rpm, en tres evaluaciones de 1 minuto cada.



Rotorod

http://www.sirna.com/img/img_mice_device.jpg

7.3. Evaluación en Sistema Nervioso Central

Ensayo global de campo abierto (“OPEN-FIELD”)

Es un *screening* biológico primario “in vivo”

En este ensayo se evalúa la incidencia de los compuestos frente a la actividad locomotora espontánea y emocional.

Se realizó a la luz normal utilizando 5 ratones de 33-35 g de peso corporal.

Se colocaron en una caja de paredes altas blancas divididas en 15 cuadrados (líneas finas). La experiencia fue realizada en completo silencio tratando de no perturbar los animales con estímulos externos.

Se administró a los animales

A) Control con solución fisiológica de cloruro de sodio 0.85%.

B) Extracto metanólico de *Eugenia uniflora* 22mg/0.4ml.

C) Fracción II de extracto de *Eugenia uniflora* 28mg/0.4ml.

Los ratones, se colocaron individualmente, en un rincón del campo y se los dejó explorar durante 5'. Registrándose el número de líneas cruzadas durante ese tiempo y también el número de acicalamientos, enderezamiento o defecaciones.

Luego de administrar la droga IP. Se esperó 5' y se llevó a cabo la prueba, nuevamente se probó a los 30'.

8. Resultados

8.1. Estudio fitoquímico

Los diferentes extractos de *Eugenia uniflora* fueron sometidos a ensayos anticonvulsivantes, los resultados fueron negativos en infusión y cocimiento, y positivos en los extractos hexánico y metanólico, de éste último se obtuvo por agregado de etanol un precipitado, la fracción FII y una fracción soluble FI, se caracterizó la presencia de diferentes grupos fitoquímicos obteniendo los siguientes resultados

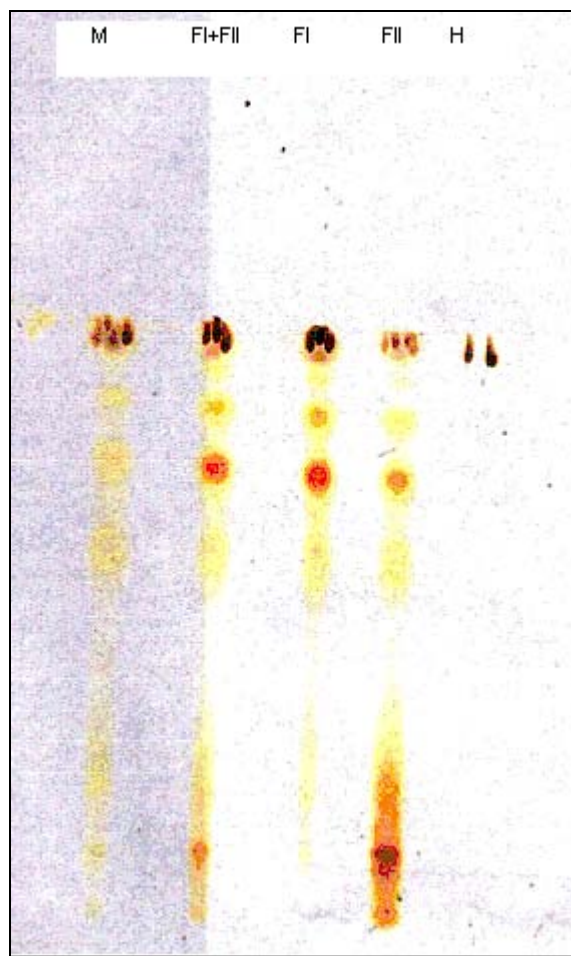
Caracterización	Ext. metanólico	Insoluble en etanol FII	Soluble en etanol FI
Taninos (R) gelatina	+ precipitado	+ precipitado	+ precipitado
Flavonoides (Shinoda)	+rojo	+ rojo	-
Polifenoles (Cloruro férrico)	+ verde	+ verde azulado	+ verde
Monosacáridos Fehling directa	+rojo ladrillo	+ rojo ladrillo	-
Polisacáridos Fehling indirecta	+ rojo ladrillo	+ rojo ladrillo	+ rojo ladrillo

8.1.1. Cromatografía analítica en capa fina

Se realizó una TLC de los extractos de *Eugenia uniflora* y de las fracciones FI y FII

Cuando se observa el cromatograma (*) a la Luz UV 366 y Luz UV 366 mas vapores de amoníaco se observa que el perfil cromatográfico del extracto metanólico y de las fracciones FI + FII juntas son similares. En el perfil cromatográfico de FI se observó un mayor numero de compuestos en el tercio superior del cromatograma en la zona de $R_f = 0,6-0,9$ y en el perfil cromatográfico de FII presentó mayor

cantidad de compuestos en el tercio inferior del cromatograma.



*Cromatograma con perfiles cromatográficos de los extractos de *Eugenia uniflora*

Teniendo en cuenta los resultados de Evaluación en Sistema Nervioso Central, Ensayo global de campo abierto (“OPEN-FIELD”) se decide continuar trabajando con la fracción FII la cual es sometida a sucesivos lavados con Hexano y posterior extracción con metanol saturado con éter de petróleo separando:

Frac. FIIA = 5.07g

Frac. F IIB = 3.70 g

Se continúa trabajando con esta fracción FIIA insoluble metanol /éter de petróleo que peso 5,0727g se somete a:

Cromatografía en columna con Sephadex LH 20

Se recolectaron 40 fracciones de 10 ml cada una. Fueron examinadas mediante TLC en distintos sistemas cromatográficos.

Las fracciones que resultaron cromatográficamente iguales se reunieron así;

FR 1-4

FR 5-8

FR 9-15

FR 16-20

FR 21-30

FR 31-40

Debido a los resultados se continuó con la fracción 9-15 se centrifugó se obtuvieron un precipitado P y un sobrenadante S. Se realizaron reacciones de caracterización

8.1.1.1. Reacciones de caracterización

Reactivos	Precipitado P	Sobrenadante S
Gelatina 2%	-	+ precipitado
Cafeína 2%	-	+ precipitado
Cloruro férrico 2%	-	+verde

8.1.2. Cromatografía descendente en papel

El precipitado P y el sobrenadante S fueron cromatografiados en papel contra testigo de Ácido Gálico, cuando se revela con solución de Cloruro Férrico se observa en el perfil del sobrenadante S una mancha de igual Rf e idéntico color que la del testigo.

8.1.3. Cromatografía en columna de celulosa

El precipitado P obtenido de la FR 9-15 fue sometido a cromatografía en columna de celulosa

Las fracciones que resultaron cromatográficamente iguales se reunieron así:

F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9.

8.1.3.1. Reacciones de caracterización de polifenoles-flavonoides

Rvo solución	F9	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1
Ácido bórico	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Cloruro férrico	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Cloruro de aluminio	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Hidróxido de potasio	-	-	-	-	+	+	+	+	+

8.1.3.2. Reacciones de caracterización de Alcaloides

Reactivo	F8	F1
Dragendorf	+	-
Mayer	-	-

8.1.4. Cromatografía en capa fina: controles cromatográficos

Después de controlar los diferentes grupos fitoquímicos se realizaron Controles cromatográficos en capa fina de las fracciones que se habían mandado a analizar por CG-MASA

Fracción	Fase estacionaria	Fase móvil	Revelado		
			UV 254	UV366	Otros
F8	Celulosa	metanol	-	3 sust.amarillas	Ninhidrina 3 sust. (2rosa viejo y 1 gris)
F8	Silicagel F254	Acetato de etilo/ac. Acético/ac. Fórmico/ Agua dest. (100:11:11:26	-	2 sust.amarillas	Ninhidrina 2 sust. rosa viejo y 1 naranja (glicinamida como sust. de referencia

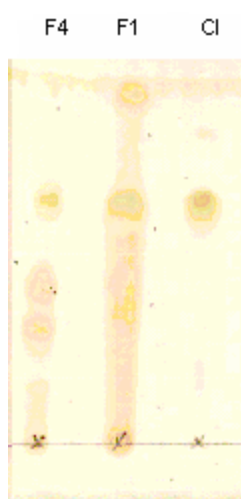
Resultados

Fracción	Fase estacionaria	Fase móvil	Revelado		
			UV 254	UV366	Otros
F-4	Celulosa	metanol	-	-	Ninhidrina 1 sust. (rosa viejo)
F4	Silicagel F254	Acetato de etilo /ác.Acético/ác. Fórmico/agua dest. (100:11:11:26	-	4 sust. 2 amarillas 2 celestes	Con vapores de amoníaco los celestes se aclaran amarillo verdoso
F4	Silicagel F254	Butanol: AD: ácido acético (4:1:1)	-	4 sust. 2pardas, 2 amarillentas	Ninhidrina 4 sust. pardo

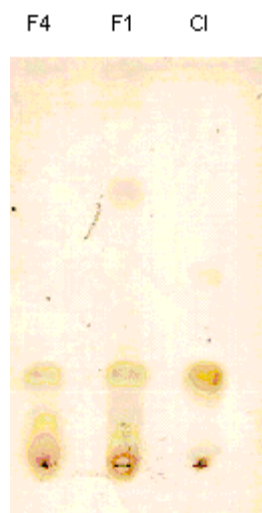
Las fracciones fueron analizadas en diferentes sistemas cromatográficos contra testigo de ácido Clorogénico y reveladas con reactivo de Ninhidrina, AEDEB y vapores de amoníaco

Fracción	Fase estacionaria	Fase móvil	Revelado		
			UV 254	UV366	Otros
F-1	Celulosa	Ácido acético 15%	-	3sust. 1 negra y 2 amarillas	Reactivo de AEDBE celeste
F-1 Sistema 1	Silicagel F254	Acetato de etilo /ác.Acético/ác. Fórmico/agua dest. (100:11:11:26	-	5 sust. 2 amarillas 2 celestes 1 parda amarillenta	Reactivo de AEDBE 2 amarillas anaranjadas 2 celestes intenso 1 parda
F-1 Sistema 2	Celulosa	Ácido Clorhídrico 1N	-	Se detecta presencia de Clorogénico contra testigo	Con vapores de amoníaco el celestes se aclara a amarillo verdoso

Las fracciones F-4 y F-1 fueron cromatografiadas en capa fina en distintos sistemas cromatográficos contra testigo de Ácido Clorogénico, cuando se revela con de Ninhidrina, AEDEB y vapores de amoníaco se observa una mancha de igual Rf e idéntico color que la del testigo.



Sistema 1



Sistema 2

8.1.5. Análisis del sobrenadante (S) de la Fracción F9-15 por CG-EM

La muestra del sobrenadante S de la fracción F9-15 fue analizada obteniendo el perfil cromatográfico de la Fig1 se observó un pico principal Tr. 16.22 debido a la posible presencia del Ácido Shiquímico y la presencia de un pico Tr. 17.010 correspondiente al Ácido Gálico, identificado.

Acquired : 28 Jun 2002 14:53 using AcqMethod FLAVON
Instrument : Instrumenten
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1

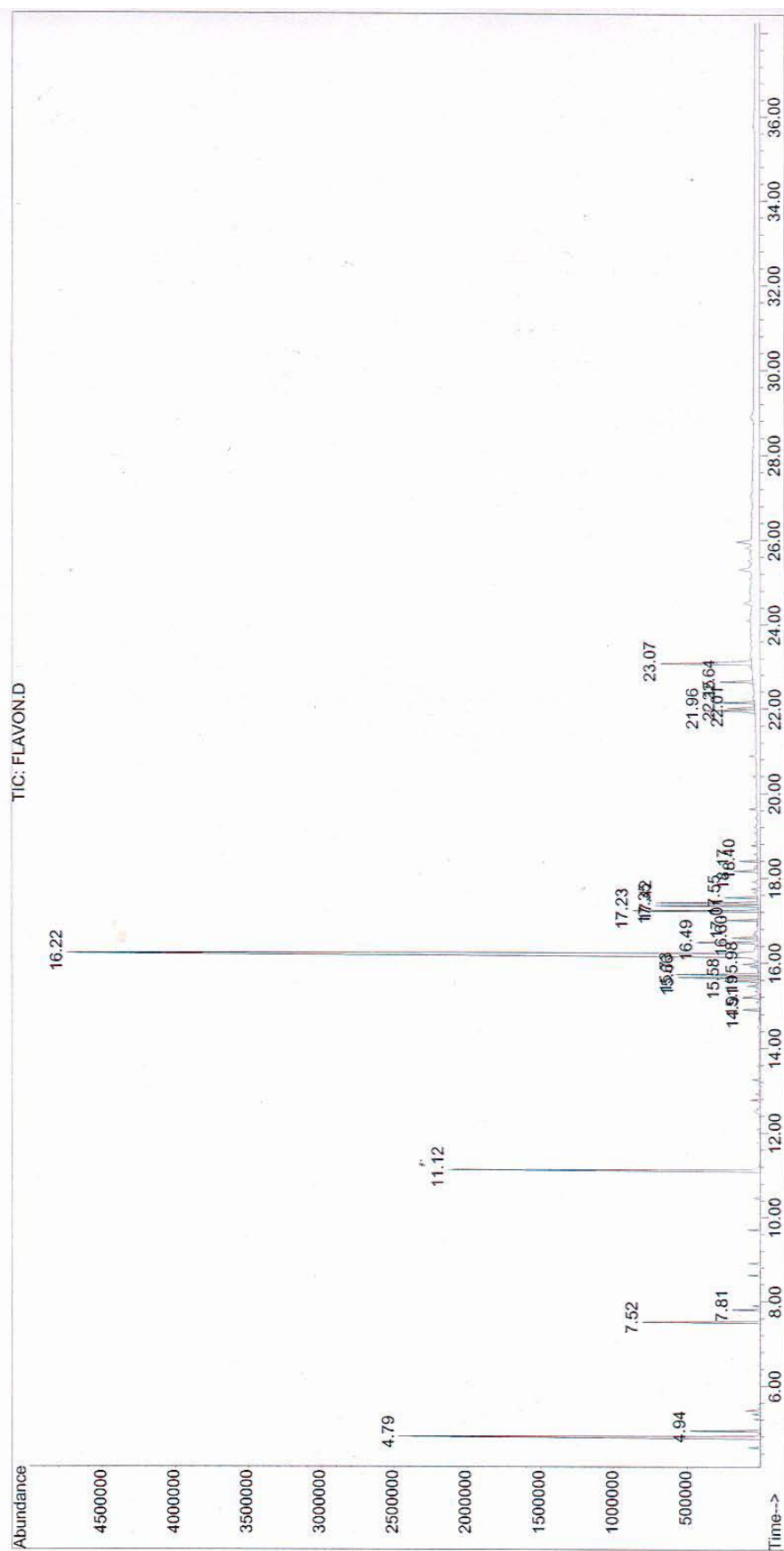


FIGURA N° 1 GC-MS de S de la Fr. 9-

8.1.5.1. COMPUESTOS IDENTIFICADOS

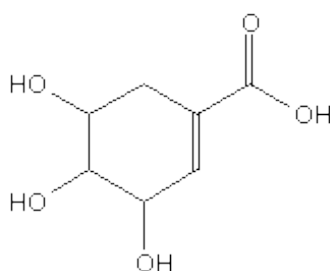
8.1.5.1.1 ÁCIDO SHIQUIMICO

En la muestra analizada por el Centro de Capacitación Analítica (ver Fig1) se observó un pico principal Tr. 16.22 debido a la posible presencia del Ácido Shiquímico, en el espectro de la Fig 2 se analizó el Ácido Shiquímico, un pico de masa ($C_7O_5H_{10}$), presentando pico base ión a m/z 345 $[M-CO_2 TMS]$, correspondiente $C_6H_7O_3$. Con la pérdida de OH^- , se obtiene el fragmento m/z 255, con la pérdida de otro OH^- el fragmento m/z 147.

El mismo espectro fue encontrado en la muestra F1 en los estudios realizados por Uymymfor en la Fig. 3 se puede observar el espectro de la muestra F1 sililada sometida análisis de cromatografía gaseosa - Espectrometría de Masa la cual dio CG-EM un único pico: F2-sil 1113 (Tr 18.551) el cual se corresponde con el espectro de la Fig.4 (igual al de la Fig. 2)

Datos del Ácido Shiquímico

- **Fórmula:** $C_7H_{10}O_5$
- **Estructura química:**



- **Peso molecular:** 174.15
- **Identificador Químico Internacional de IUPAC:**
 - InChI=1/C7H10O5/c8-4-1-3(7(11)12)2-5(9)6(4)10/h1,4-6,8-10H,2H2,(H,11,12)
- **Número de registro CAS:** 138-59-0
- **Otros nombres:** 1-Cyclohexene-1-carboxylic acid, 3,4,5-trihydroxy-, [3R-(3 α ,4 α ,5 β)]-; Bracken fern toxic component;

Shikimate; Shikimic acid; 1-Cyclohexene-1-carboxylic acid, 3,4,5-trihydroxy-; 3,4,5-Trihydroxy-1-cyclohexene-1-carboxylic acid .

- **Precursor biogenético** de algunos compuestos polifenólicos

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\280602\FLAVON.D
Operator :
Acquired : 28 Jun 2002 14:53 using AcqMethod FLAVON
Instrument : Instrument
Sample Name :
Misc Info :
Vial Number: 1

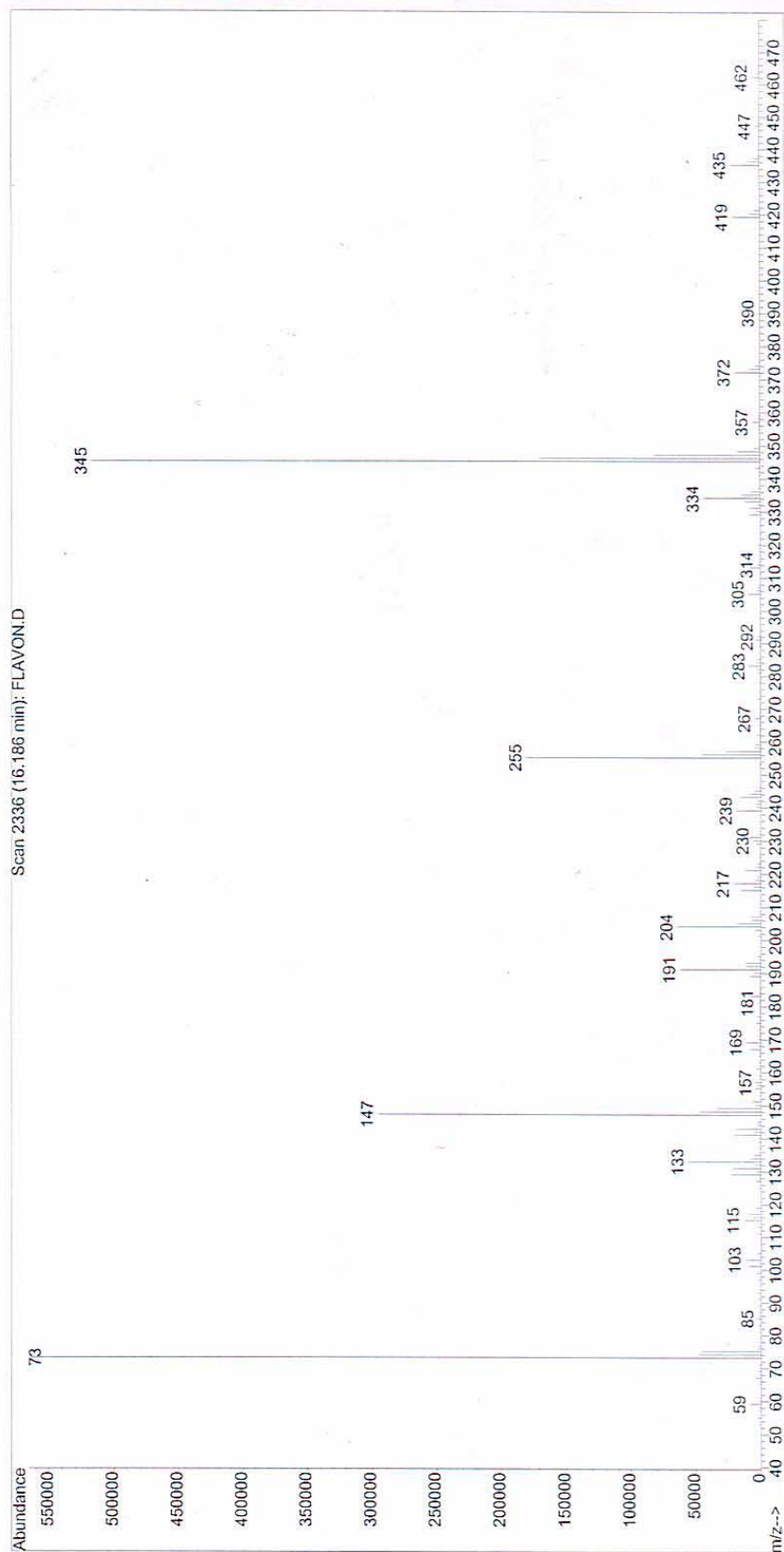


FIGURA N° 2

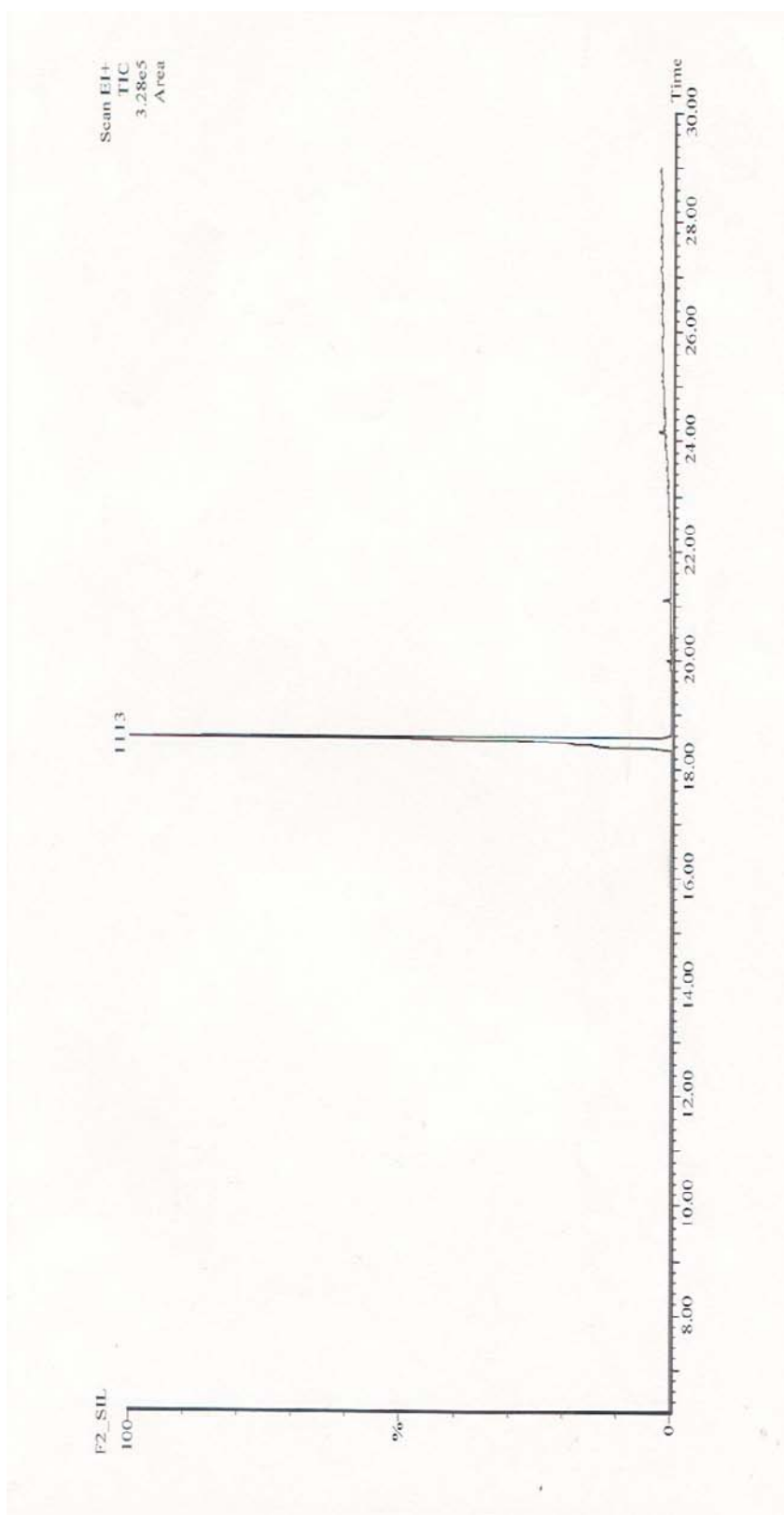


FIGURA N°3

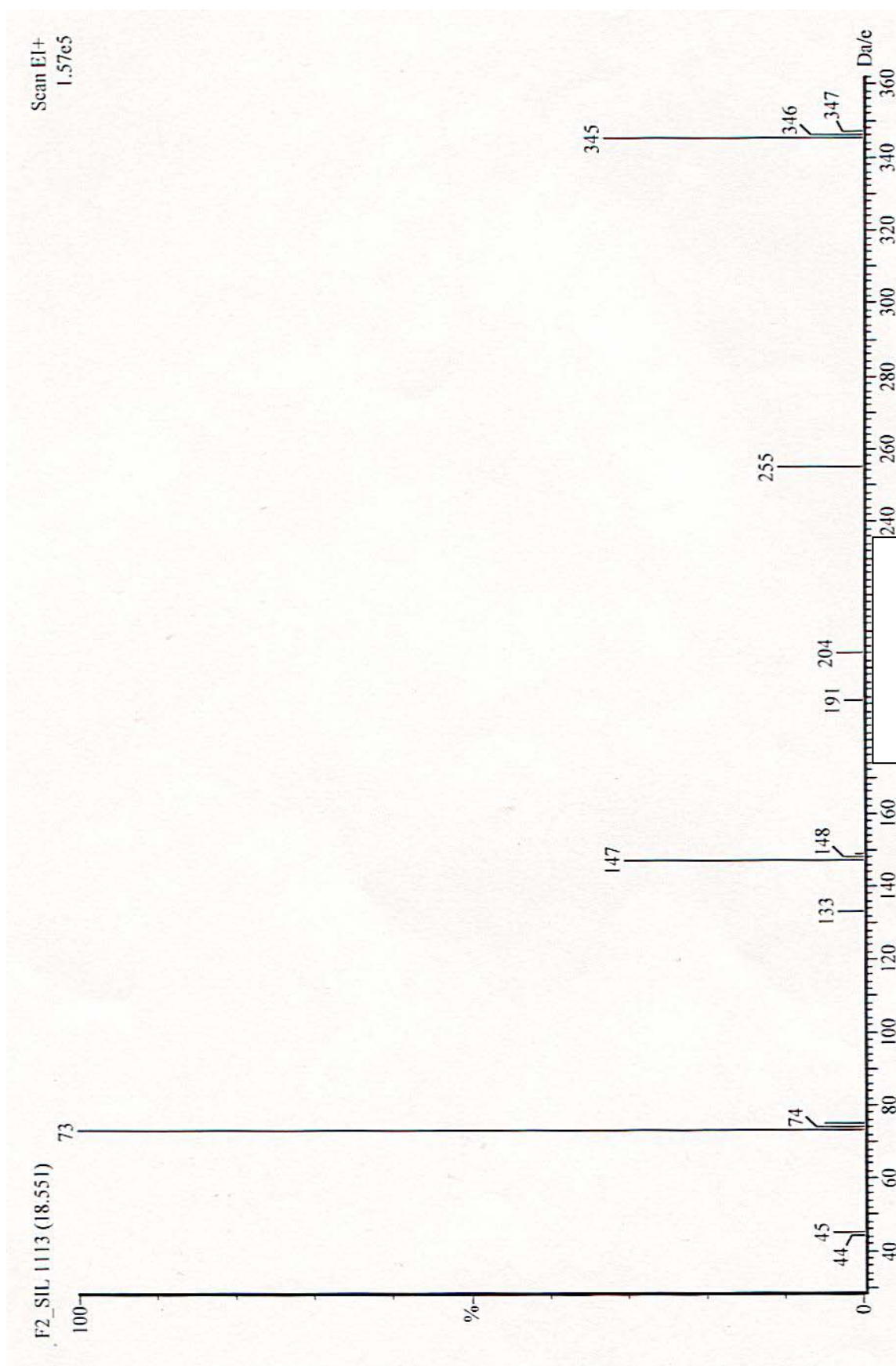


FIGURA N° 4

8.1.5.1.2. ÁCIDO GÁLICO

En la muestra del sobrenadante de la fracción F9-15 analizada por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa en las condiciones expresadas en Pág.77 se obtuvo en el cromatograma (Fig. 1) con un Tr 17.010 min, el espectro de masa correspondiente a este Tr. está en la Fig.5, se encuentra un pico de masa m/z 458 correspondiente $C_7H_6O_5$, un pico base m/z 281 ($M-CO_2$ TMS), correspondiente a $C_6O_3H_5$. Con la pérdida de un OH^- se obtiene el fragmento m/z 179.

El análisis del sobrenadante de la fr. 9-15 por CG-MS con la base de datos Wiley 275 L dio los siguientes resultados

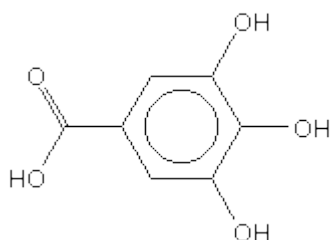
15	17.01	0.85	C:\Database\WILEY275.L			
			Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimet...	251969	002078-17-3	99
			Benzoic acid, 3,4,5-tris(trimet...	251968	002078-17-3	94
			3,5-Dioxa-4-phospha-2-silahepta...	255269	031038-14-9	14

Pico de Tr. 17.010 min: su espectro de masa coincide en un 99% con el espectro del Ácido Gálico, confirmando la presencia, ya detectada en la cromatografía descendente, de Ácido Gálico.

Datos del Ácido Gálico

Fórmula: $C_7H_6O_5$

Estructura química:



Peso molecular: 170.12

Identificador Químico Internacional de IUPAC:

InChI=1/C7H6O5/c8-4-1-3(7(11)12)2-5(9)6(4)10/h1-2,8-10H,(H,11,12)

Número de registro CAS: 149-91-7

Otros nombres: Benzoic acid, 3, 4, 5-trihydroxy-;

3, 4, 5 -Trihydroxybenzoic acid; Kyselina gallova;

Kyselina 3, 4,5-trihydroxybenzoova

(<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\280602\FLAVON.D
Operator :
Acquired : 28 Jun 2002 14:53 using AcqMethod FLAVON
Instrument : Instrumen
Sample Name:
Misc Info :
Vial Number: 1

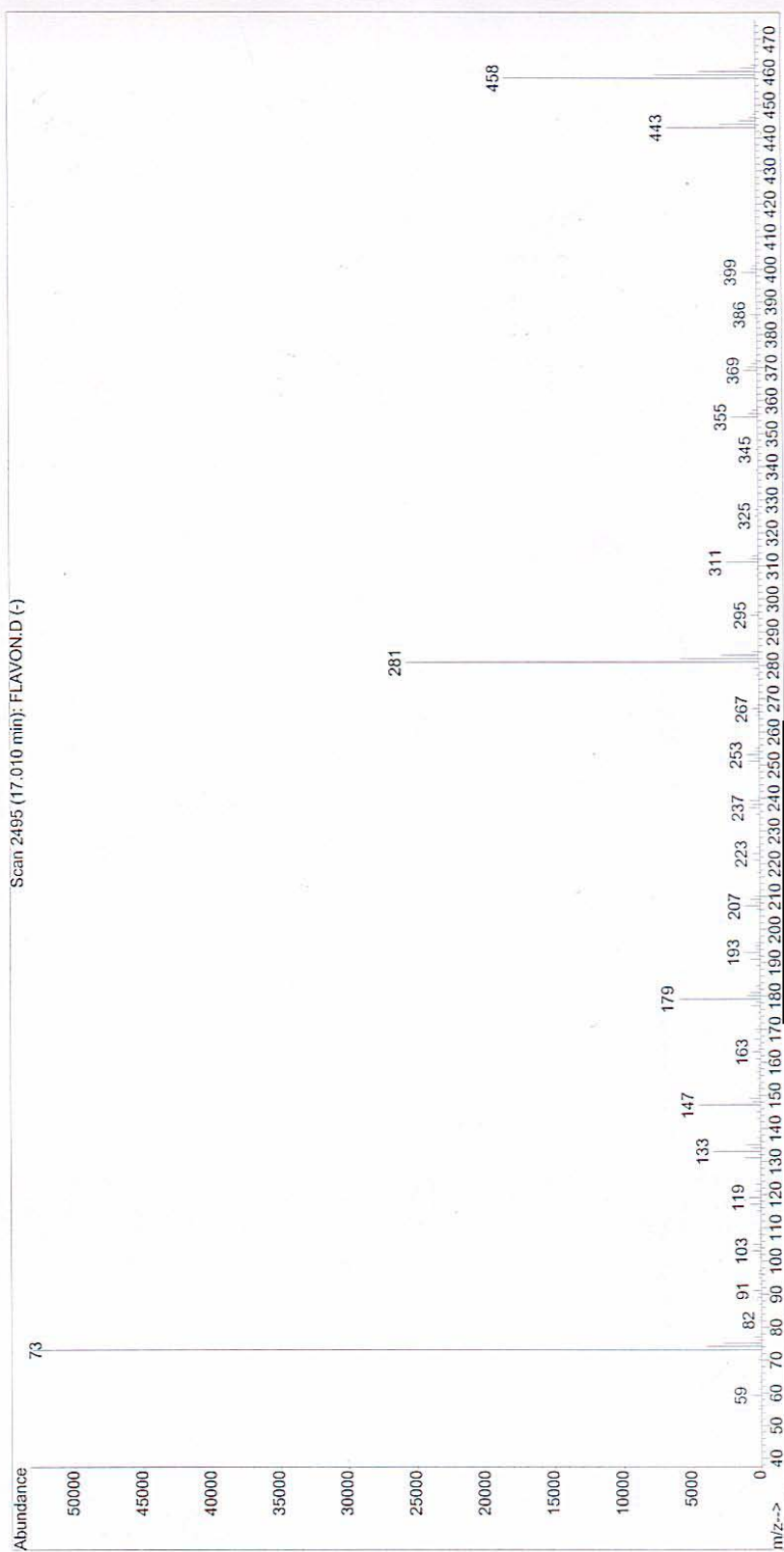


FIGURA N° 5

8.1.6. Análisis del sobrenadante S Fr.9-15 por HPLC-DAD

8.1.6.1. COMPUESTO IDENTIFICADO: ÁCIDO CLOROGÉNICO

Una muestra del sobrenadante S de la fracción 9-15 fue sometida a un análisis HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

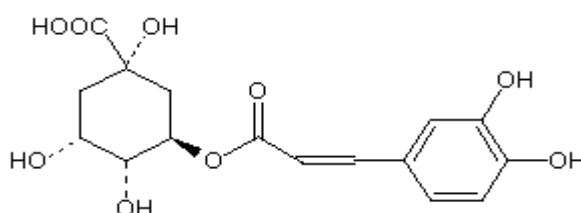
Con detector de UV fijado a una longitud de onda de 280 nm.

El compuesto con Tr 16798, mostró las bandas de absorción UV en metanol a 325 y 245 nm con un hombro en 295 nm típicas del ácido cafeico, como se puede observar en Fig. 6.

El compuesto había sido identificado en el precipitado P de la misma fracción, aplicando cromatografía en capa fina, contra muestra patrón en distintos sistemas cromatográficos los R_f, así como el característico revelado con luz UV 366 color celeste que con vapores de amoníaco pasa a verde, coincidían con el Ácido Clorogénico ver pág.88.

Fórmula: C₁₆H₁₈O₉

Estructura química:



Peso molecular: 354.31

Número de registro CAS: 327-97-9

Otros nombres: 3-caffeoylquinic acid; 3-(3,4-dihydroxycinnamoyl) quinic acid; [1S-(1.alpha., 3.beta., 4.alpha., 5.alpha.)]-3-[[3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl] oxy] 1trihydroxycyclohexanecarboxylic acid; 1, 3, 4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate).

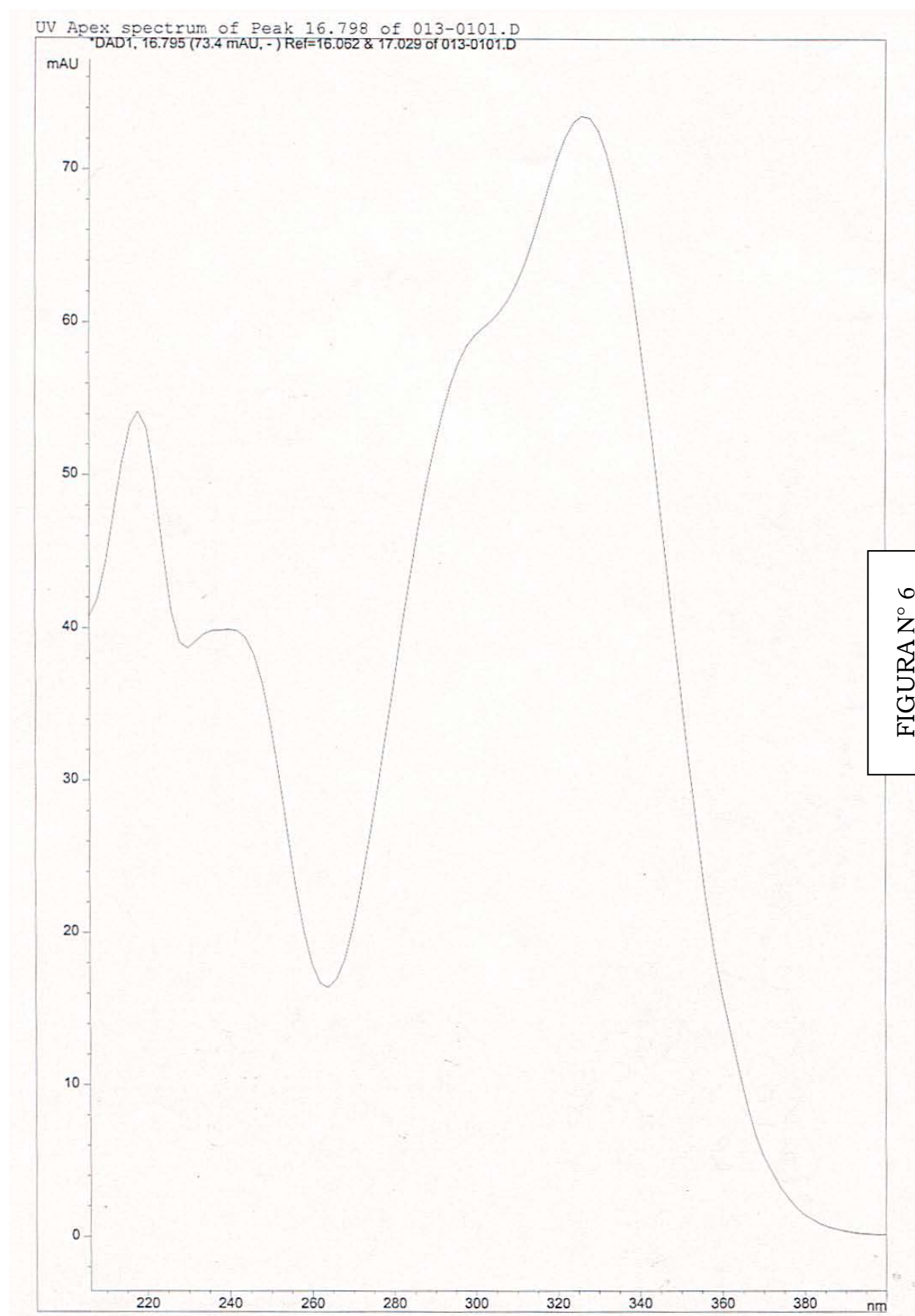


FIGURA N° 6

8.1.7. Análisis del Precipitado P de la Fr.9-15 por CG-MS

8.1.7.1. Análisis de la Fracción 8

Realizado por Uymfor (unidad de microanálisis y métodos físicos de química orgánica- FCE y N-UBA-CONICET)

La fracción F8 fue provista para ser analizada por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa en un espectrómetro TRIO "VG.

En esta Fr.F8 se observa un pico principal correspondiente a un posible derivado de un ácido carbámico (Tr 7.867) y picos minoritarios correspondientes a hidrocarburos alifáticos (Tr 9.6 y 15.151) y un hidrocarburo aromático (Tr 13.118)

8.1.7.2. COMPUESTO IDENTIFICADO: N-BUTIL-CARBAMATO DE ETILO

En el cromatograma de la Fig. 7 se observa un pico de Tr. 7.867 que dio un espectro de masa que se puede analizar en la Fig. 8, donde se encuentra un ión molecular m/z 145 $[M]^+$, correspondiente con la fórmula molecular; $C_7H_{15}NO_2$.

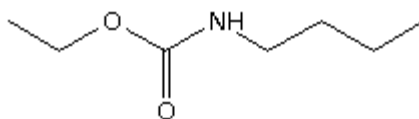
El pico base a m/z 102 $[M-R+H]^+$ correspondiente a $CH_3-(CH_2)_3-NH-CO-$.

El fragmento m/z 57 se corresponde con el etilo $-CH_2-CH_3$, que se perdió.

Con los datos aportados por la base de datos Data System se llega a la fórmula del ácido carbámico, butil-etil, ester, el que presenta total coincidencia en el patrón de estructura Ver Fig. 9, por lo cual el compuesto (Tr. 7.867) queda identificado.

Fórmula: $C_7H_{15}NO_2$

Estructura química:



Peso molecular: 145.20

Identificador Químico Internacional de IUPAC:

InChI=1/C7H15NO2/c1-3-5-6-8-7(9)10-4-2/h3-6H2,1-2H3,(H,8,9)

Número de registro CAS: 591-62-8

Otros nombres: N-Butyl-O-ethylurethane; Butylurethane; N-Butylurethane; Ethyl butylcarbamate; Ethyl N-butylcarbamate; Butylcarbamic acid, ethyl ester; Ethyl-N,N-butylcarbamate; BUR; 1-Butylurethan; 1-Butylurethane

<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Struct=C591628>

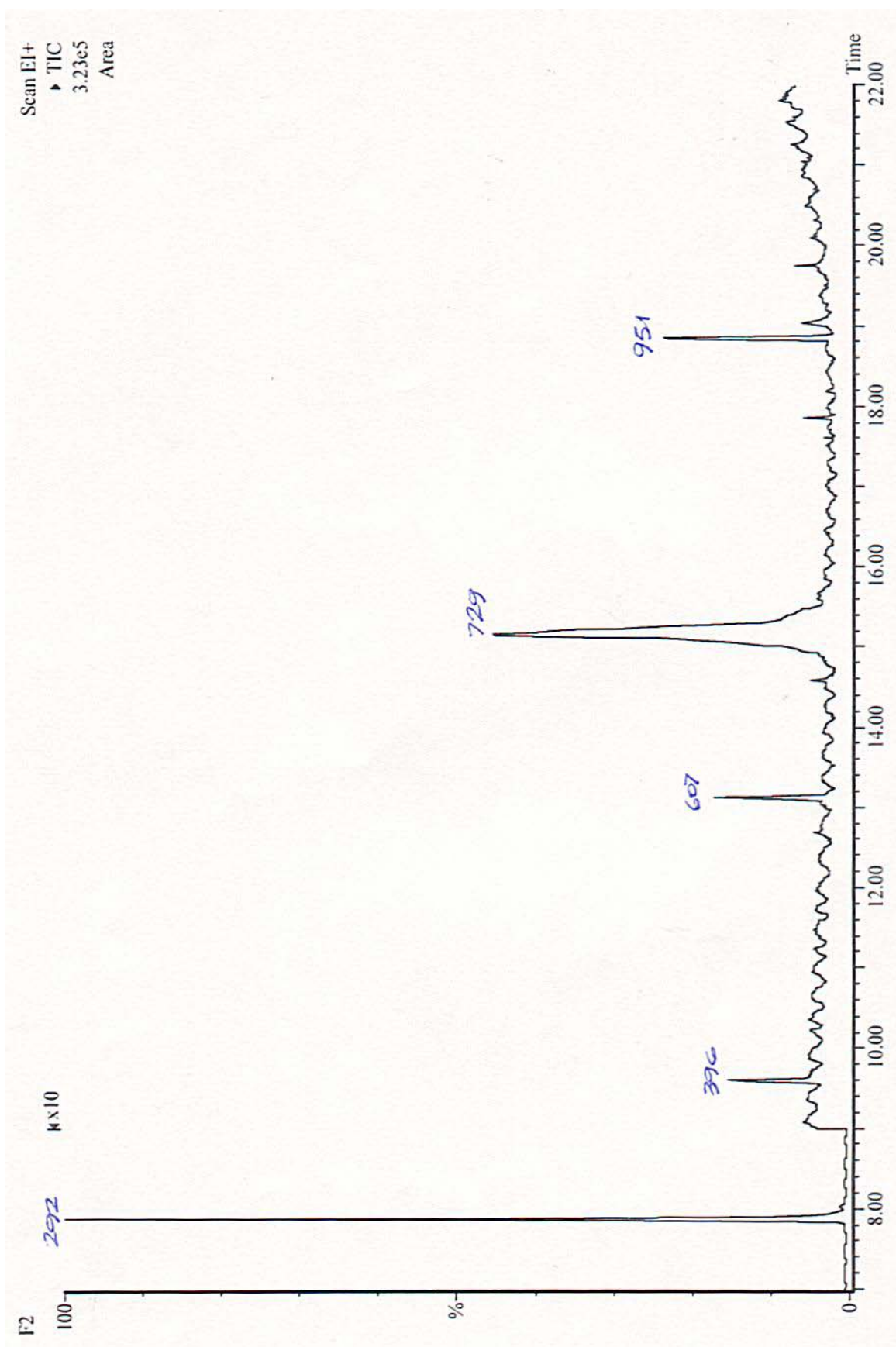


FIGURA N° 7

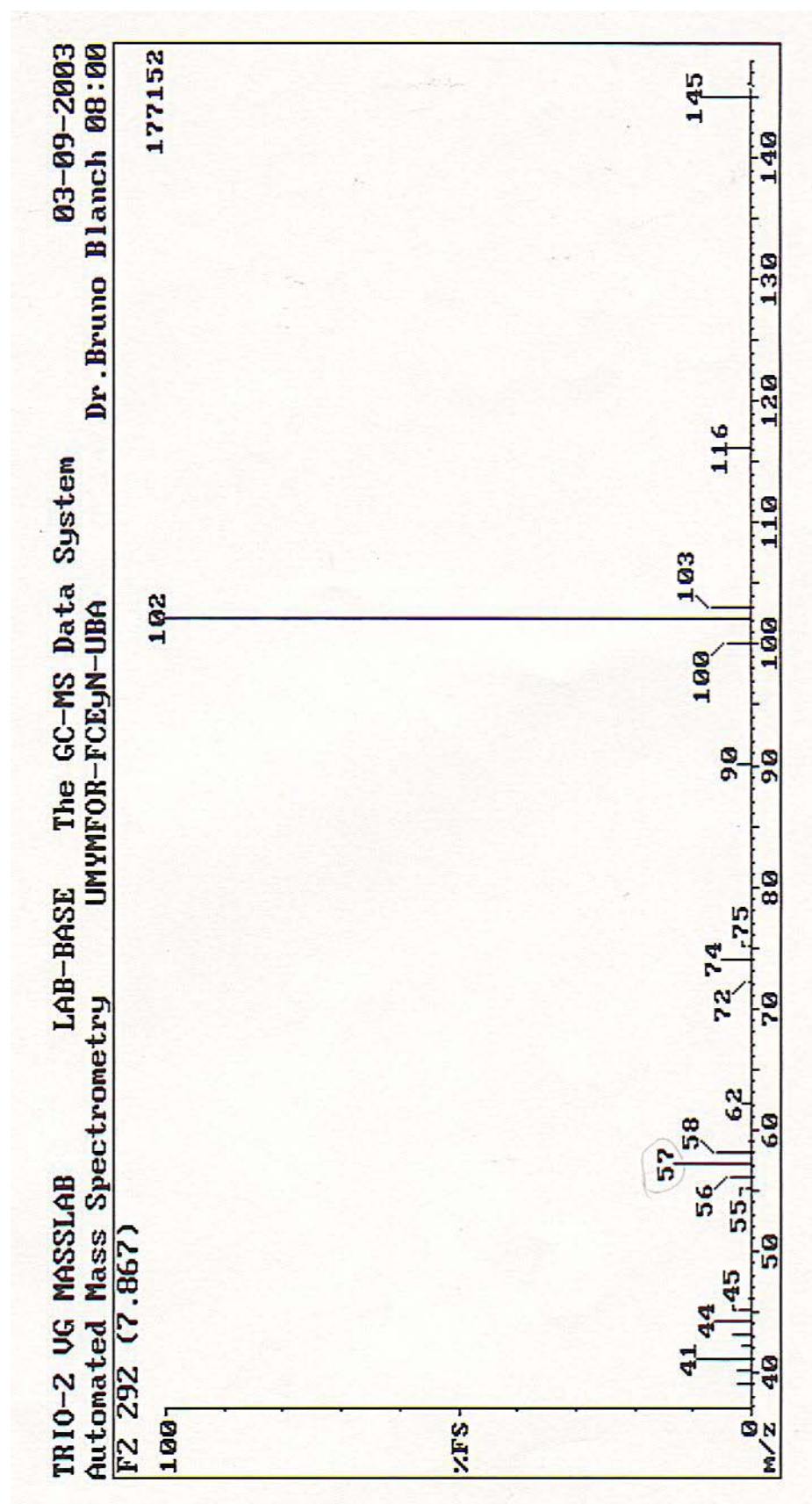


FIGURA N° 8

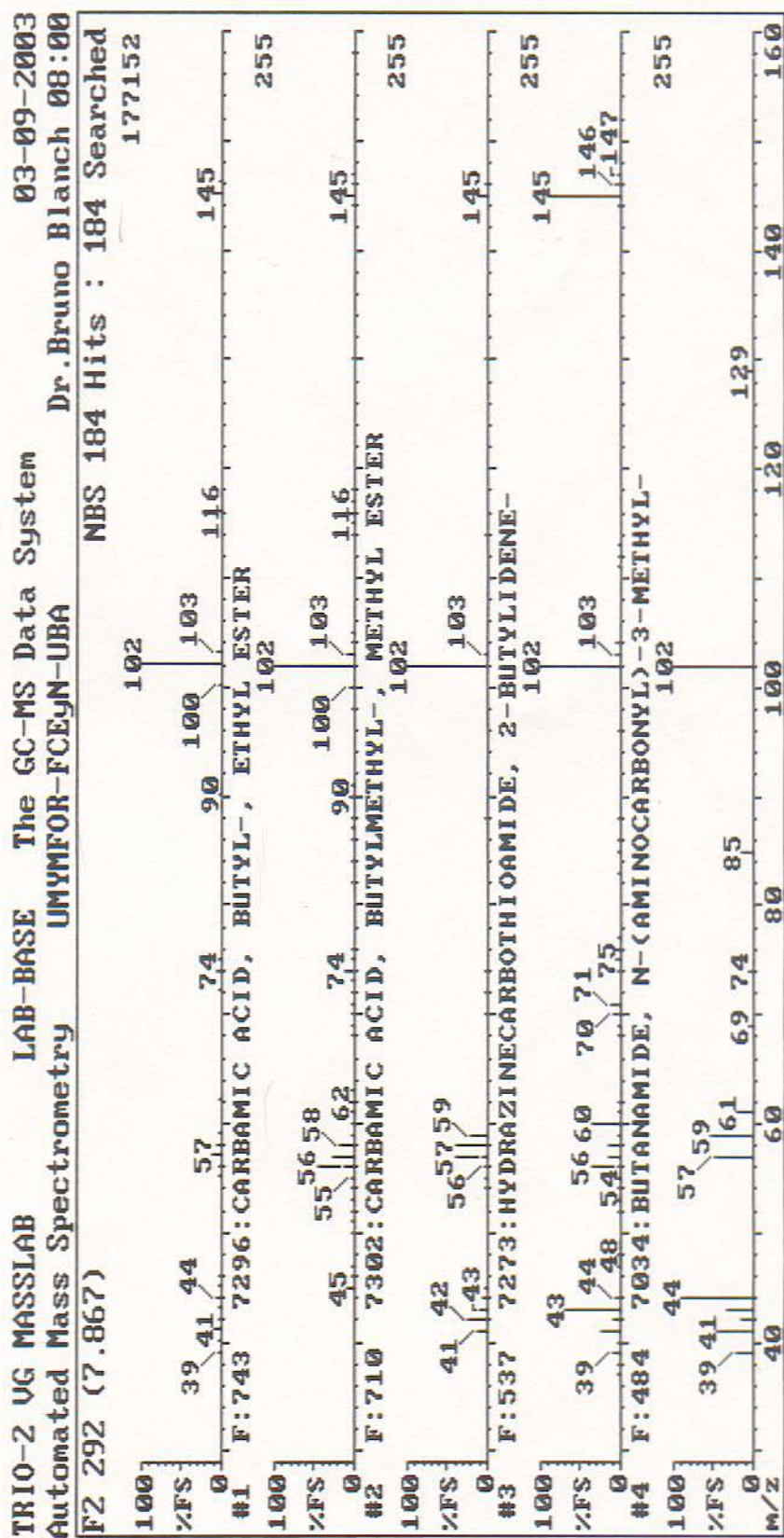


FIGURA N° 9

8.1.7.3. Análisis de la fracción 1

Se realizó HPLC (Cromatografía de alta resolución) con detector de UV perfil Fig.10, el pico Tr. 1.157 presentó el espectro que podría corresponderse con el descripto para del Ácido Shiquímico. Espectro de UV, etanol λ_{max} 212 nm. Ver Fig.11

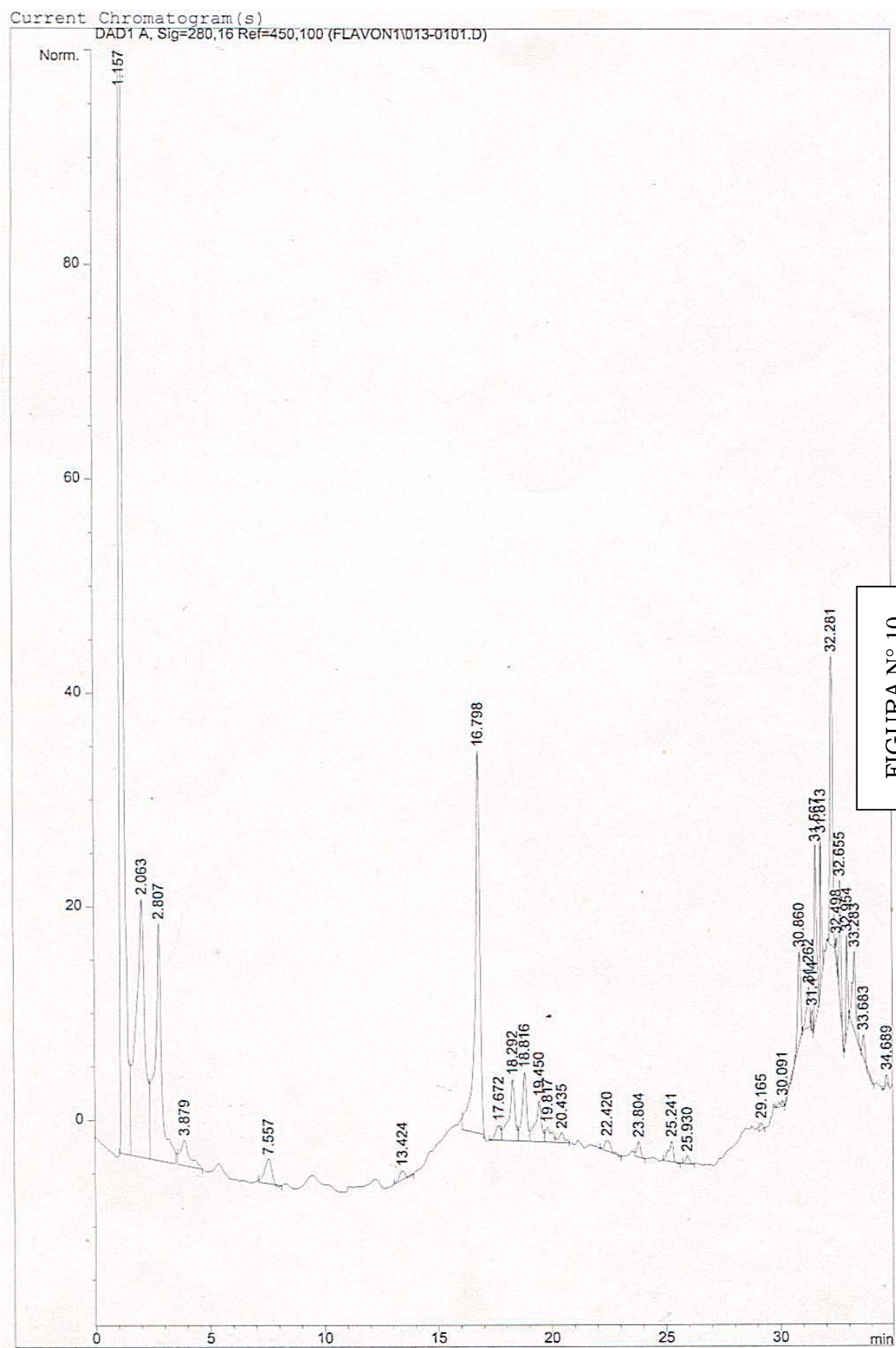


FIGURA N° 10

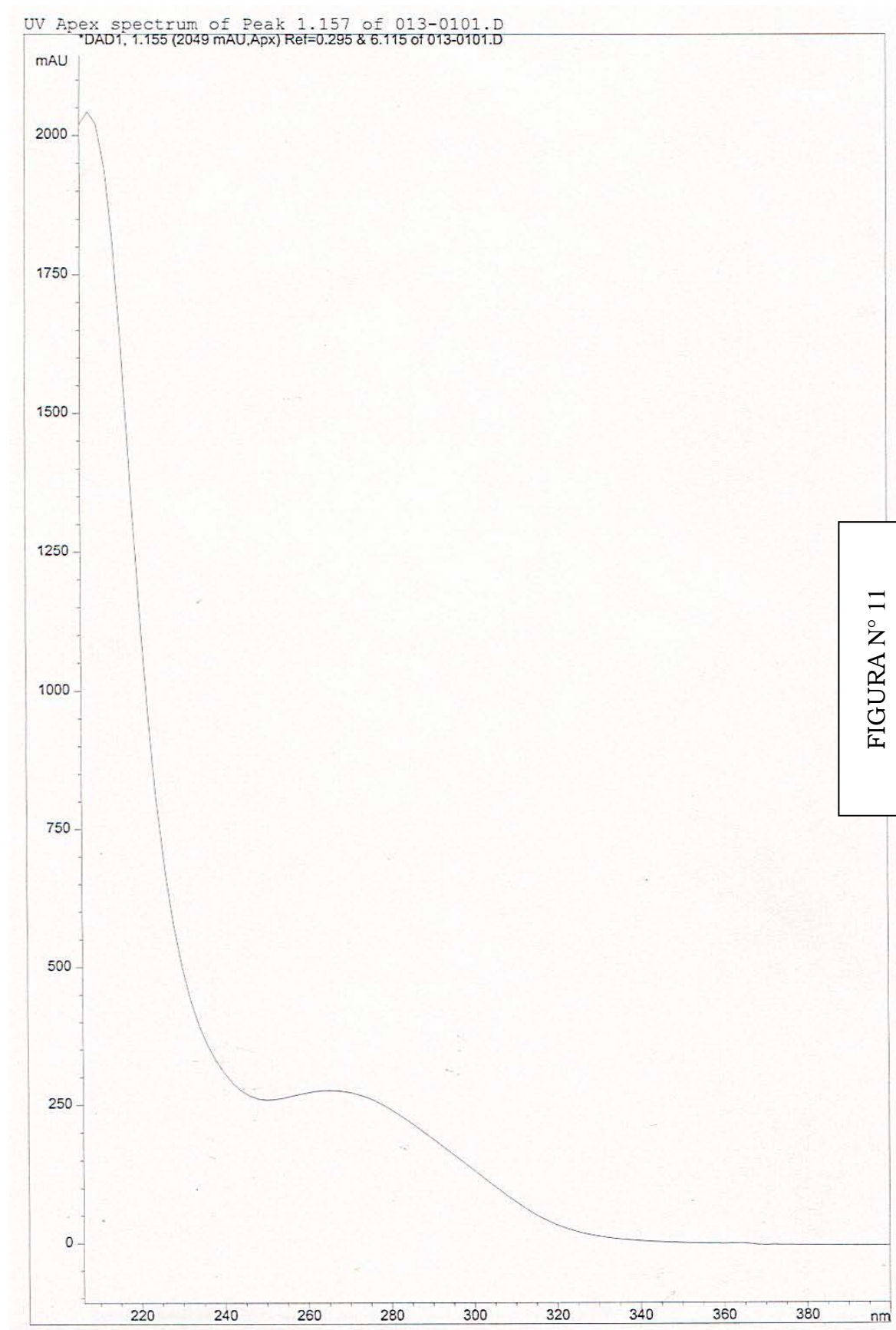


FIGURA N° 11

8.2. Resultados de la actividad anticonvulsiva

Eugenia uniflora, es utilizada por la población bajo las formas de infusión y cocimiento es por eso que en un primer paso se ensayó por vía oral la actividad anticonvulsiva de las mismas obteniendo los resultados que se detallan a continuación

	Vía de administración	Dosis: mg/kg	tiempo	Actividad anticonvulsiva
Infusión	Oral	200	30 minutos	1/4
Infusión	Oral	200	1 hora	0/4
Infusión	Oral	200	2 horas	0/4
Infusión	Oral	200	4 horas	0/4
Cocimiento	Oral	200	30 minutos	1/4
Cocimiento	Oral	200	2 horas	0/4
Cocimiento	Oral	200	4 horas	0/4

Posteriormente la actividad anticonvulsiva de *Eugenia uniflora* fue considerada positiva en los extractos metanólico y hexánico después fue sometida evaluación en la fase I y II de acuerdo al Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program del National Institute of Health (NIH) (Swinyard et al, 1989)

La determinación del TPE (*Time of Peak Effect*): Los porcentajes de protección y neurotoxicidad se registraron y trazaron en función del tiempo igualmente con los TPE representados en los cuadros.

Se realizó una evaluación de la dosis efectiva (ED50): grupos de 8 animales se inyectaron vía IP en TPE determinado según lo descrito anteriormente. Por lo menos 4 dosis entre las que no producían ninguna protección (0% de los animales) y la protección total 100 % de los animales ensayados. Los porcentajes de la protección en cada dosis (convertida al probit) fueron trazados contra registro-dosis respuesta. Estos datos fueron luego sometidos a análisis estadístico y las ED50 con intervalos de confianza del 95% las líneas de regresión y

los errores estándar de las tendencias fueron estimados (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

A las dosis ensayadas según el programa de evaluación, los extractos no producen neurotoxicidad sobre los ratones, la cual se hubiera manifestado por ataxia. No se observó protección frente al MES test, pero si hubo protección frente al PTZ.

8.2.1. Fase I de identificación anticonvulsiva

Permite obtener un panorama general del tipo de protección anticonvulsiva, frente a diferentes dosis, en distintos tiempos en extracto H (hexánico) y M (metanólico) los resultados se observan en el siguiente cuadro:

Test	Tiempo	30mg/kg *		100mg/kg *		300mg/kg *	
		H	M	H	M	H	M
MES	30min	0/1	0/1	0/3	0/3	0/1	0/1
PTZ	30min	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Rotorod	30min	0/2	0/2	0/4	0/4	0/2	0/2
Mes	4 h	0/1	0/1	0/3	0/3	0/1	0/1
PTZ	4 h	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
Rotorod	4 h	0/2	0/2	0/4	0/4	0/2	0/2

*n° de animales protegidos/ n° de animales testeados.

La ausencia de convulsión clónica observada durante el ensayo con PTZsc, indica que los extractos tienen la habilidad de elevar el nivel umbral de convulsión del PTZsc., además no producen ataxia en el rotorod en las dosis administradas.

8.2.2. Fase II: cuantificación anticonvulsiva

Esta fase se realiza teniendo en cuenta los resultados de la fase anterior. Debido a la protección que presentó frente a PTZsc se continúa trabajando con este test.

Determinación del TPE(*Time of Peak Effect*)

PTZsc	Dosis mg/kg*							
	100		200		300		400	
Tiempo	H	M	H	M	H	M	H	M
15min	0/8 NT	0/6 NT	2/5 NT	0/6 NT	0/6 NT	0/6 NT	0/8 NT	0/6 NT
30min	0/8 NT	0/6 NT	3/8 NT	1/6 NT	0/8 NT	0/6 NT	0/8 NT	0/6 NT
1hora	3/6 NT	3/8 NT	2/6 NT	2/6 NT	4/8 NT	2/6 NT	0/8 NT	0/8 NT
2horas	2/6 NT	1/6 NT	0/8 NT	0/6 NT	0/8 NT	0/6 NT	0/8 NT	0/8 NT
4horas	0/8 NT	0/8 NT	0/8 NT	0/8 NT	0/8 NT	0/8 NT	0/8 NT	0/8 NT

*n° de animales protegidos/ n° de animales testeados.

NT: no se observó neurotoxicidad.

Se determinó la protección anticonvulsiva inducida por PTZsc y se observó su efecto máximo a la hora de ser administrados los extractos, a las dosis indicadas, no se observó neurotoxicidad ni otros efectos indeseables.

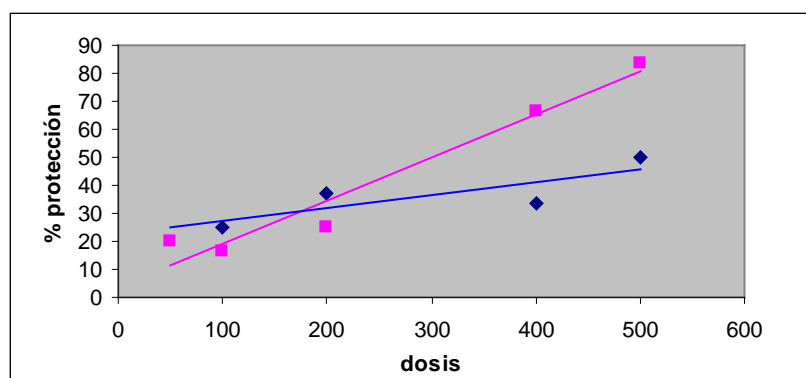
En la fase II se realizó la determinación de la dosis efectiva media (ED₅₀) de los extractos metanólico (M) y hexánico (H) comparando los mismos con sustancias puras como Ácido Valproico, Fenitoína, y Valpramida., los resultados se observan en la siguiente tabla:

Compuesto	ED ₅₀ MES (mg/kg)	ED ₅₀ PTZ (mg/Kg)
<i>Eugenia uniflora</i> H	NE	222 (145-340)
<i>Eugenia uniflora</i> M	NE	160.4 (86- 299)
Acido Valproico	145 (114-185)	181.6 (166.3- 198.3)
Fenitoína	4.64 (2.98-7.23)	NE
Valpramida	50.5 (38.2-66.6)	70.1 (63.9-76.8)

NE: no efectiva.

8.2.3. Evaluación comparativa de la protección efectuada por los distintos extractos

dosis	Hexánico	Metanólico
50		20
100	25	16,66667
200	37,5	25
400	33,3	66,66667
500	50	83,3



Posteriormente se evaluó la actividad anticonvulsiva de las fracciones 1-4 y 9-15 y del Ácido Gálico, destacándose un 50 % de efectividad en la fracción 9-15

	Vía de administración	Dosis: mg/kg	Tiempo	Actividad anticonvulsiva
Fracción 1-4	IP	200	1 Hora	0/4
Fracción 9-15	IP	200	1 Hora	2/4
Fracción 9-15	IP	200	30 minutos	3/4
Ácido Gálico	IP	100	1 Hora	0/4
Ácido Gálico	IP	200	30 minutos	0/4

8.3. Resultados de Ensayo global de campo abierto (“OPEN-FIELD”)

Defecación: en el control A en los 5´ una defecación y a los 30´ 2 defecaciones.

En el control B: no hubo defecación ni a los 5´ ni a los 30´.

En el control C: a los 5´, 2 veces, y a los 30´ no hubo.

Acicalamientos:

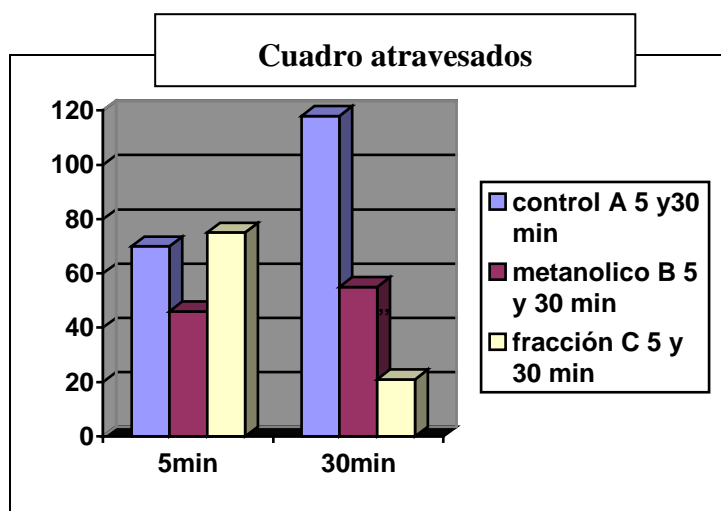
En el control A a los 5´, 2 acicalamientos

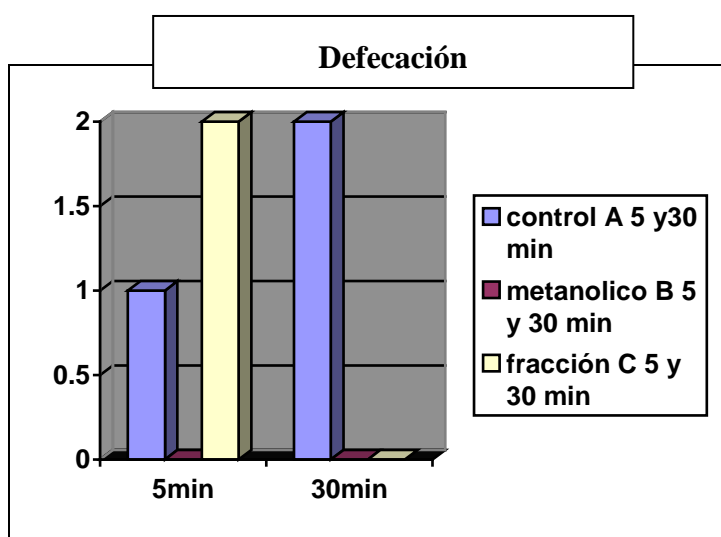
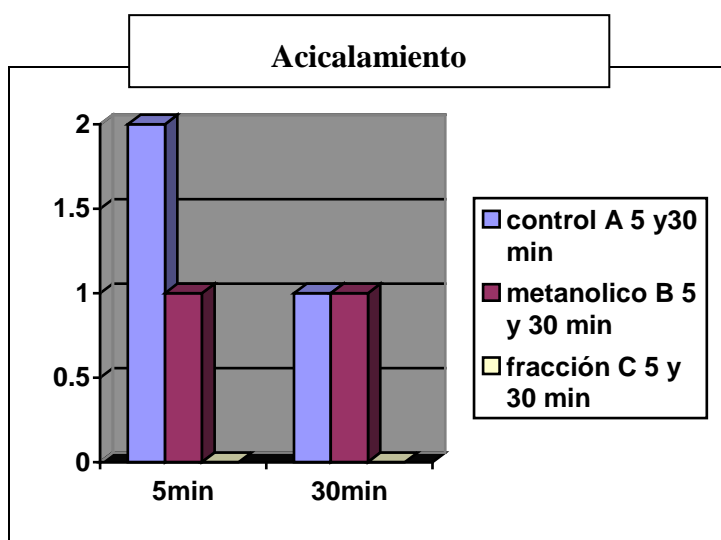
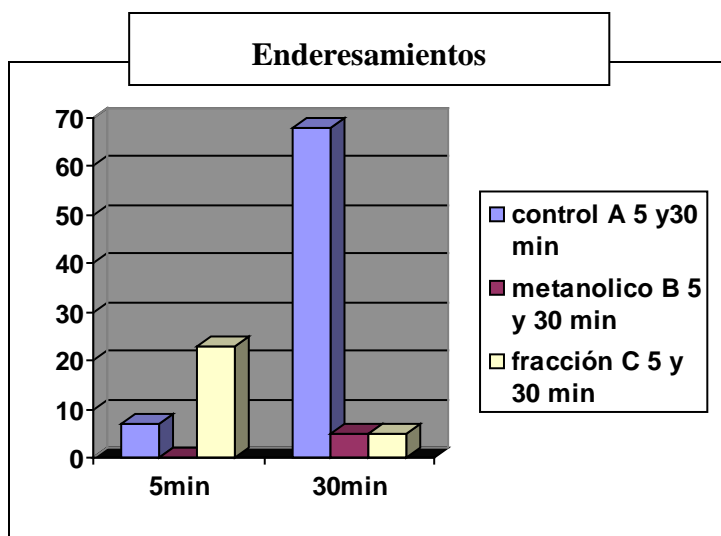
En el control A a los 30´, 1 acicalamiento.

En el control B a los 5´, 1 acicalamiento.

En el control B a los 30´ 1 acicalamiento.

En el control C a los 5´ y a los 30´ no hubo acicalamientos.





9. Discusión

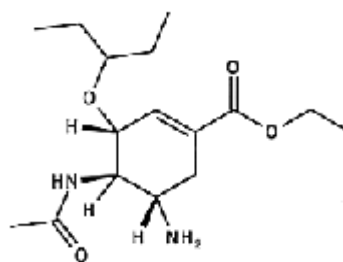
Los extractivos hexánico y metanólico demostraron una actividad anticonvulsiva importante, el metanólico mostró una mejor respuesta. Del fraccionamiento del extracto metanólico la fracción 9-15 presentó una actividad anticonvulsiva 50% efectiva en una dosis de 200 mg/kg a la hora posterior a su administración, dando durante los primeros 30 minutos 75 % efectividad, aumentando el umbral de las convulsiones clónicas inducidas por la administración de PTZsc, este comportamiento puede considerarse indicador de un mecanismo relacionado con el ácido gammaaminobutírico (GABA) (Meza-Toledo et al, 1998). Recordemos que el GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante del SNC, cuyo desbalance se encuentra asociado a varias enfermedades neurológicas, entre las que se encuentra la epilepsia. Los resultados obtenidos, protección frente a PTZ, nos permitirían vincular que la posible acción anticonvulsiva de alguno de los compuestos aislados está asociada al mecanismo de acción gabaérgico (Löscher W., Leppik I. E., 2002). La posible explicación de la actividad del extracto hexánico la encontraríamos en la presencia del linalool en su aceite esencial, la actividad del mismo fue estudiada y demostrada como positiva frente a convulsiones inducidas por PTZ, y el sinergismo que presenta el mismo con otros compuestos anticonvulsivantes (Elisabetsky, E, 1999)

El **N-BUTIL-CARBAMATO DE ETILO** identificado en el análisis del Precipitado P de la Fr.9-15 por CG-MS presenta similitud estructural con un nuevo antiepiléptico Retigabine (Rijn CM, Willems-van Bree E.2004) Se realizó un análisis de esta molécula mediante inteligencia artificial, usando química computacional que permite interpretar los resultados con un criterio predictivo, de este estudio surge que este compuesto tiene una alta probabilidad de presentar protección frente a PTZ. El **N-BUTIL-CARBAMATO DE ETILO** estaría involucrado en la actividad anticonvulsivante de *Eugenia uniflora*.

La presencia del **Ácido Clorogénico** identificado en el extracto metanólico de *Eugenia uniflora* se puede relacionar con muchas de las actividades biológicas que han presentado los extractos de esta especie, en distintos ensayos biológicos/farmacológicos. Podría considerarse al ácido clorogénico como uno de los polifenoles responsables de la actividad antioxidante que presenta el extracto metanólico. Este compuesto podría participar del efecto diurético e hipotensor detectado en los ensayos farmacológicos realizados, los trabajos de París y Moyse, 1971, citados por Tramil, 1991 lo describen como estimulante, expectorante, diurético y colerético.

La identificación de **Ácido Gálico**, de conocida actividad astringente y estíptica (Index Merck), en el extracto analizado permite justificar el uso tradicional de *Eugenia uniflora* como antidiarreica. Por otra parte su presencia en el extracto corrobora la presencia de taninos hidrolizables (presentes en todas las especies de *Eugenia*) cuya actividad antidiarreica es conocida.

La presencia del **Ácido shiquímico** permite relacionar el uso tradicional de *E. uniflora* en estados gripales. El ácido shiquímico actualmente es considerado como una droga clave en la síntesis del Tamiflu. Tamiflu, es el nombre registrado del medicamento que el laboratorio Roche comercializa la droga oseltamivir, única especialidad medicinal antiviral efectiva contra el virus H5N1 de la gripe aviar: Para la elaboración de este medicamento se utilizan las semillas de *Illicium verum* ("Anís estrellado") del cual se extrae el ác. Shiquímico y cuya producción mundial se centra en Asia, principalmente China



Oseltamivir

10. Conclusiones

- El extracto metanólico de *Eugenia uniflora* mostró actividad antiepiléptica importante, con una $ED_{50} = 160.4$ mg/kg frente a PTZ, elevando el umbral de crisis inducida por el shock eléctrico máximo. Esta actividad puede compararse con la actividad antiepiléptica del Ácido Valproico. No presentó toxicidad.
- La fracción 9-15 presentó a una dosis de 200 mg/kg una actividad anticonvulsiva 50% efectiva a la hora, dando hasta los 30 minutos 75 % efectividad, aumentando el umbral de las convulsiones clónicas inducidas por la administración de PTZsc
- Se lograron identificar cuatro compuestos en la fracción activa, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido shiquímico que fue encontrado en numerosas especies vegetales que presentaron actividad anticonvulsiva y un nuevo compuesto N-BUTIL-CARBAMATO DE ETILO posiblemente relacionado con su actividad anticonvulsivante.

11. Bibliografía

- Adebajo, A.C., Oloke, K.J., Aladesanmi, A.J., (1989). Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia* 60 (5), 451-455.
- Adesina, S.K. (1982) Studies on some plants used as anti-convulsants in Ameridian and African traditional medicine. *Fitoterapia* 53 (5-6), 147-162.
- Adewunmi, C. O., Agbedahunsi, J. M., Adebajo, A. C., Aladesanmi, A. J., Murphy, N., Wando, J., (2001) Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *J. Ethnopharmacol.*, Limerick, 77, 19-24.
- Aji, B. M., Onyeyili, P.A., Osunkwo, U.A. (2001) The central nervous effects of *Mitagyna africanus* (Willd) stem bark extract in rats *Journal of Ethnopharmacology*. 77, (2- 3), 143-149.
- Almeida C.E., Karnikowski M.G.O., Foletto R., Baldisserotto B. (1995) Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saúde Pública*. [periódico en la Internet]. Dic [citado 2007 Abr 09]; 29(6): 428-433. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101995000600002&lng=es&nrm=iso
- Amat A. G. y Vajia M.E. (1991) Plantas Medicinales y Etnofarmacología en la Provincia de Misiones (Argentina) *Acta Farm. Bonaerense* 10 (3) 153-9.
- Arai, I., Amagaya, S., Komatsu, Y., Okada, M., Hayashi, T., Kasai, M., Arisawa, M., Momose, Y., (1999) Improving effects of the

extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J Ethnopharmacol.*68(1-3):307-14.

- Arteché García, Alejandro(1998) Fitoterapia. Vademecum de prescripción. Plantas medicinales. Editorial: Masson, S.A.
- Ashok, K., C., Mahaveer, P. D., Bhuwan, C. J. (1988) A review of medicinal plants showing anticonvulsant activity *Journal of Ethnopharmacology* 22, 11-23.
- Asociación Internacional por el Cannabis como Medicamento (2007) recuperada el 18/07/2007 de (<http://www.acmed.org/spnish/patients-use.htm#epilepsie>).
- Bandoni, A. L., Mendiando, M. E., Rondina, R.V.D., Coussio, J.D., (1972). Survey of argentine medicinal plants. I. Folk-lore and phytochemical screening. *Llodya* 35, 69-80.
- Bruneton, J. (1995). Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants.
- Consolini, A., Baldini, O., Amat, A.(1999).pharmacological basic for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive.*Journal of ethnopharmacology* 66, 33-39.
- Consolini, A. E., Gracia Sarubbio, M., (2002). Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 57-63.
- Dimitri Milanj (1988) *Enciclopedia argentina de Agricultura y Jardinería*.1 (2),819-820.

- Duke's(2005) Phytochemical and Ethnobotanical
Recuperado el 29/05/2005 de la base de datos
<http://www.ibiblio.org/london/permaculture/mailarchives/pc-homepage/msg00583.html>.
- Elisabetsky, E., Coelho de Souza, G.P., (1999). Anticonvulsant properties of linalool and γ - decanolactone in mice. *Acta hort.*501, ISHS.227-231.
- *Farmacopea Argentina* VI Ed., p.1235.
- García, M. (2006) Expertos argentinos prueban con éxito una droga contra la epilepsia. Recuperado el 14 de mayo 2007 de la base Infobae
(<http://www.infobae.com/notas/nota.php?Idx=273918&IdxSeccion=100541>).
- Gilani, A.H., Aziz, N., Khan, M. A., Shaheen, F., Jabeen, Q., Siddiqui, B. S., Herzig, J.W.,(2000) Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology* 71, (1-2),161-167.
- Grijalbo, Ed. (1973). *Todo sobre Jerusalén bíblica*. Barcelona. España (p 172).
- Ha Hee Jeoung, Lee Ung Dong, Lee Tae Jae, Kim Sook Jin, Yong Soon Chul, Kim Ae Jung, Ha Sang Jung, Huth Keun.(2000). 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* B1. is active in the antioxidation and GABA ergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of Ethnopharmacology*.73 (1-2), 329.

- Haron, N. W., Moore, D., and Harbone., (1992). Distribution and Taxonomic Significance of Flavonoids in the Genus *Eugenia* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 20 (3),266-26.
- International Plant Names Index (2006).Recuperado 15/05/2006 de http://florawww.eeb.uconn.edu/acc_num/199200005.html
- Kanazawa, A., Patin, A., and Greene, A. E. (2000) Efficient, Highly Enantioselective Synthesis of Selina-1,3,7,(11)-trien--8- one, a Major Component of the Essential Oil of *Eugenia uniflora*.. *J. Nat. Prod.*, 63. 1292-1294.
- Kasture Veena, S., Deshmukh, V. K., and Chopde, C.T. (2002). Anxiolytic and Anticonvulsive Activity of *Sesbania grandiflora* Leaves in Experimental Animals. *Phytother.Res.*16, 455-460.
- Lee, M., Nishimoto, S. Yang, Ll. Yen, K. Hatano, T. Yoshida, T. Okuda,T. (1997) Two Macrocyclic Hydrolysable Tannin Dimers From *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry* 44 7: 1343-1349
- Lee,M., Chiou, J. F.,Yen, K.Y., Yang,L.L.(2000). EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Lett.* 154(2):131-136.
- Litchfield, J. and Wilcoxon, R., (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96, 99-113.
- Löscher, W. , Leppik, I.E., (2002). Critical reevaluation of previous preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs. *Epilepsy Research* 50, 17-20.

- Matsumura, T., Kasai, M. Hayashi, T., and Arisawa, M., Momose, Y., Arai, I., Amagaya, S. and Komaysu, Y. (2000) α -Glucosidase Inhibitors from Paraguayan Natural Medicine, Ñangapiry, the Leaves of *Eugenia uniflora*. *Pharmaceutical Biology*, 38,(4), 302-307.
- Markham, K. R. (1982) Techniques of flavonoids identification. *Academia Press* ed., New York. 1-113.
- Meilán (2000) Anestesia Para la Cirugía de la Epilepsia. Parte I. Hospital de la Princesa. Madrid. Recuperado el 3/07/2007 de <http://www.uam.es/departamentos/medicina/anesnet/forconred/neuro/epilepsia/epilepsia1.htm>
- Menéndez Castillo, R. A. Pavón González V. (1999). Artículo de Revisión, *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana Plant Med* 3(3) 110-15.
- Miranda Claudio (2000) recuperado el 30/03/2005 de <http://www.epilepsiadechile.com/discurso.doc>.
- Morton, J. (1987). Surinam Cherry. p. 386–388. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton. Miami, recuperado 18/07/2006 de http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/surinam_cherry.html.
- Mukherjee, P. K., Saha, K., Murugesan, T., Mandal, S.C., Pal, M., Saha, B.P. (1998). Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of specific region of West Bengal, India *J. Ethnopharmacology*. 60 (1), 85-9.

- Museo alemán de la epilepsia. Recuperado el 20/03/2006 de <http://www.epilepsiemuseum>
- Museo Nacional de Historia Natural y Antropología (MUNHINA) Estampilla(2007) uruguaya de *Eugenia uniflora*, recuperado el 20 de mayo 2007 de <http://www.mec.gub.uy/munhina/seflora.htm>
- Navarro Moll., (2000) Uso racional de las plantas medicinales " *Pharm Care Esp* 2: 9-19.
- NIH (National Institute of Health) (1996) Revised Guide for the care and use of laboratory animals. 25 (28).
- Nogueira, E., Vassilieff, V.S. (2000) Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis* .*Journal of Ethnopharmacology*. 70 (3), 275-280.
- Odenigbo Obi, G., Awachie Ifeacho, P. (1993) Anticonvulsant activity of aqueous ethanolic extract of *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia* ,64(5),447-449.
- Ogunwande, I.A., Olawore, N.O., Ekundayo, O., Walker, T.M., Schmidt, J. M. (2005). Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L Setzer. p147-152
- OMS (2003) La OMS clasifica aspirina como medicamento esencial. Recuperado el 15 /07/ 2007 <http://www.bayaspirina.com.ar/Noticias.asp?IdNoticia=4>.
- Paris RR, Moyse H. (1971) *Matière Médicale*. Ed.Masson & Cia., Paris.. Tome III, p 420.

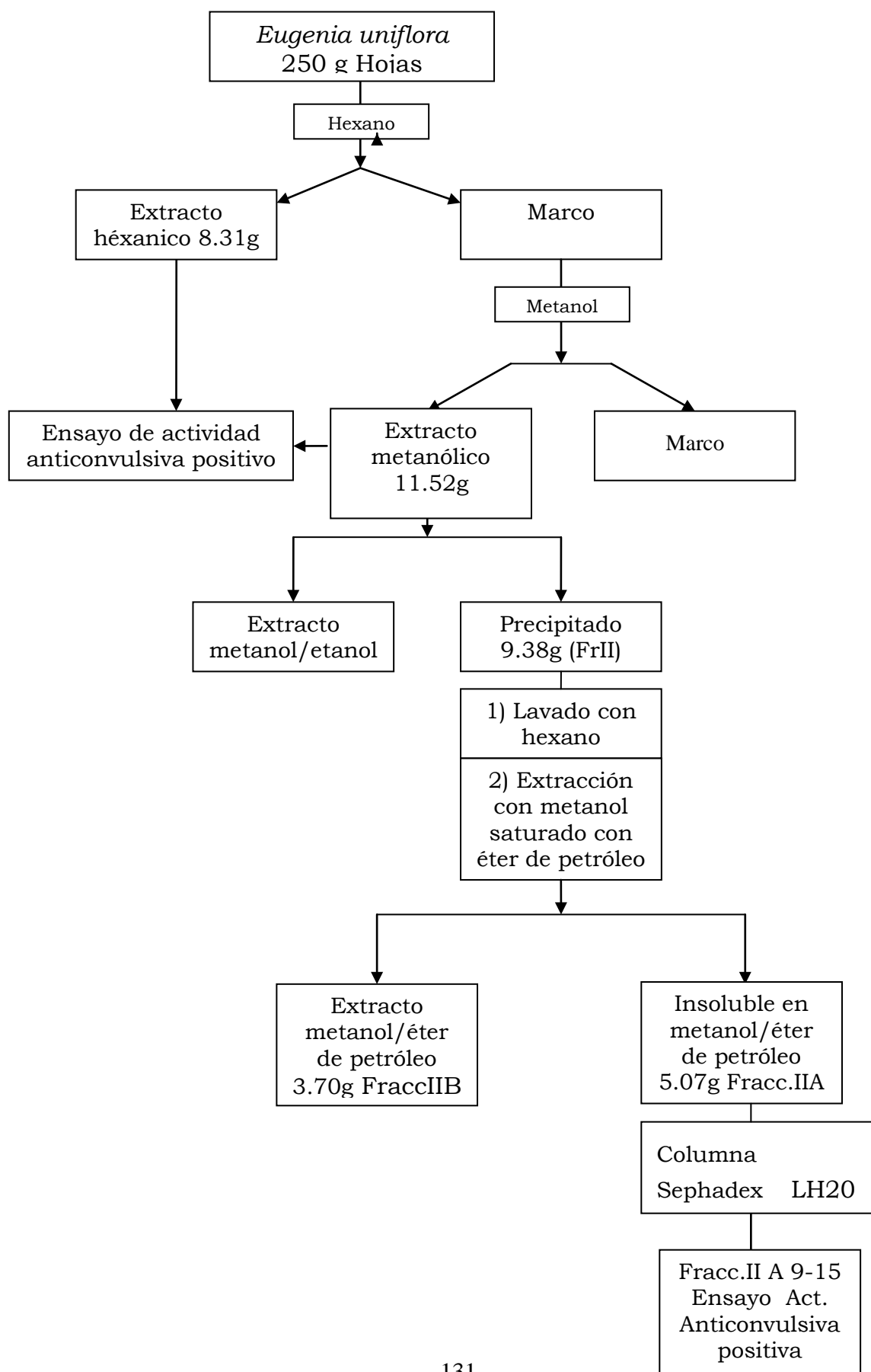
- PDR (2000) Herbal Medicines. Medical Economics Company, Montvale. Second Edition. pp 463-4.
- Pérez de Alejo, J. L., Rodríguez, G., Miranda Flores, R. (1998) Actividad anticonvulsivante de las fracciones Butanólica y Acetato de Etilo de la *Indigofera suffruticosa* Mill(Añil Cimarrón). *Rev. Cubana Plant. Med*; 3(3) ,7-11.
- Perez,C., Anesini, C.(1994). “Inhibition of pseudomonas aeruginosa by argentinean medicinal plants”. *Fitoterapia* 65 (2), 169-172.
- Pourgholami M. H., Kamalinejad M., Javadi M., Majzoob S., Sayyah M.,(1999) Evaluation of the anticonvulsant activity of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *Journal of Ethnopharmacology* 64,167-171.
- Pourgholani, M.H., Kamalinejad, M., Javadi, M., Majzoob, S., Sayyah, M. (1999). Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *Journal of Ethnopharmacology* 64 , 167-171.
- Rijn, C.M., Willems-van Bree, (2004) A four-ligand hypercube model to quantify allosteric interactions within the GABA receptor complex *JPharmacol.* 485 (1-3), 43-51.
- Schapoval, E. E. S., Silveira, M. L., Miranda, C. B., Henriques, A. T., (1994). Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology* 44,137-142.

- Schemeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E., Rojas de Arias, A., (1987). Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 21, 183-186.
- Stables, J.P.; Kupferberg, H.J.(1989) National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Anticonvulsant Screening Project Raport. Chapter 16.
www.ninds.nih.gov/about_ninds/anticonvulsant_srceening_project.htm.
- Tsuda, T., Sugaya, A., Ohguchi H., Kishida, N., and Sugaya E.(1997) Protective Effects of Peony Root Extract and Its Components on Neuron Damage in the Hippocampus Induced by the Cobalt Focus Epilepsy Model. *Experimental neurology* 146, 518-525.
- Velazquez, E., Tournier, H.A., Mordujovich de Buschiazzo, P., Saavedra, G., Schinella, G.R.(2003) Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*.74 (1-2),91-7.
- Villar del Fresno, Angel M. (editor) (1999) "Farmacognosia general". Pág.94 España. Editorial síntesis.
- Waslawik, E., Da Silva, M.A., Peters, R., Gomes Correia, J., Rocha Farías, M., Calixto, J., Ribeiro-do Valle, R.M. (1997).Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 49 (4), 433-437.
- Wagner, H. y Bladt, S. (1996). Plant Drug Análisis. 2nd ed. Spring-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.(29)303.
- Weyerstahl,P., Marschall- Weyerstahl, H., Christiansen, C.,

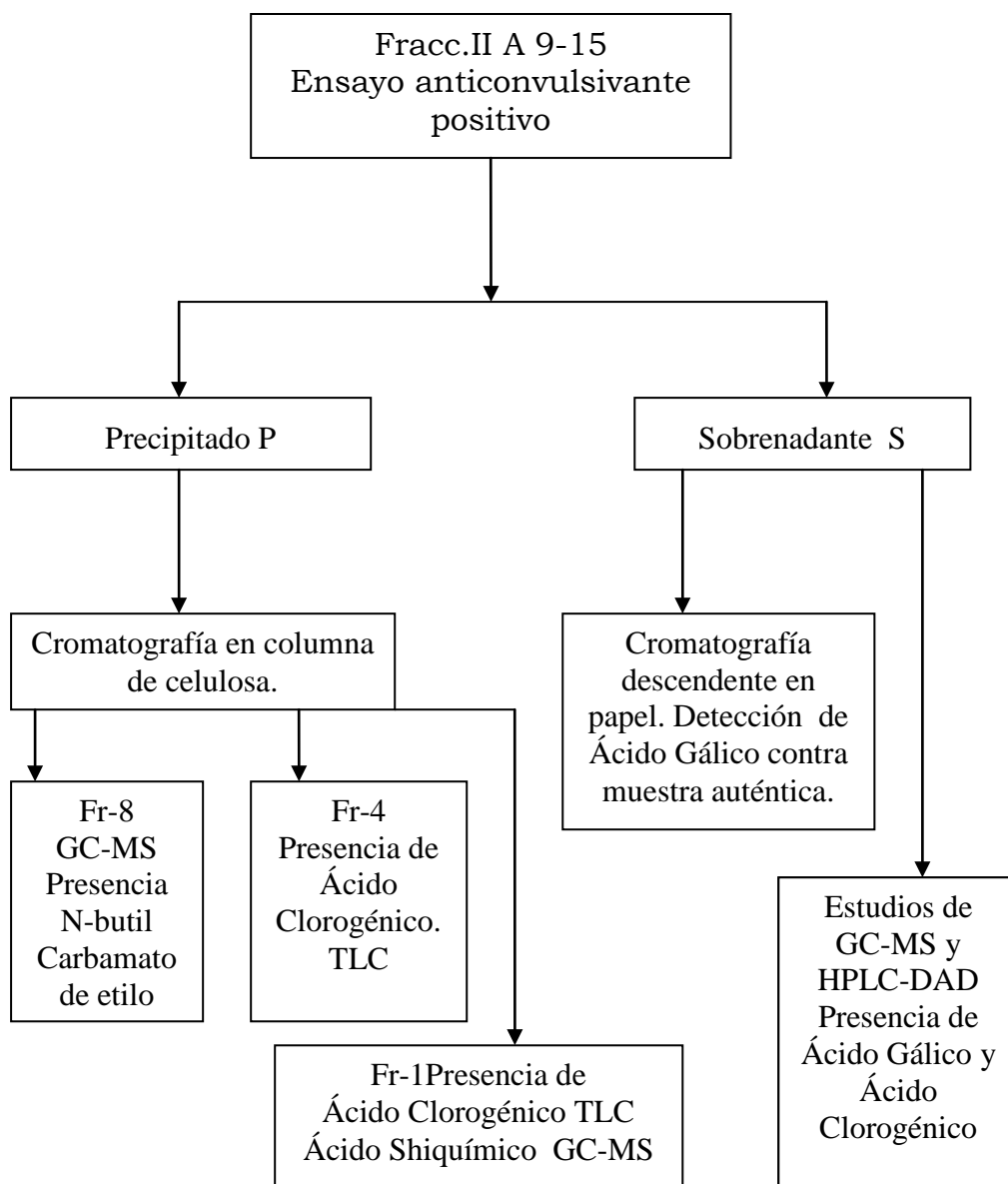
Oguntimein, B.O., and Adeoye . A. O. (1988). Volatile Constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta medica* 546-549.

- Yajía, M.E., González, C: F., Lorca C.L., Amat, A. G., De Battista, G. A., Sánchez González, F., (1997). “Toxicidad general y genotoxicidad de los extractivos de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Anales de la Sociedad Argentina para la investigación de productos aromáticos* 15: 229-237.

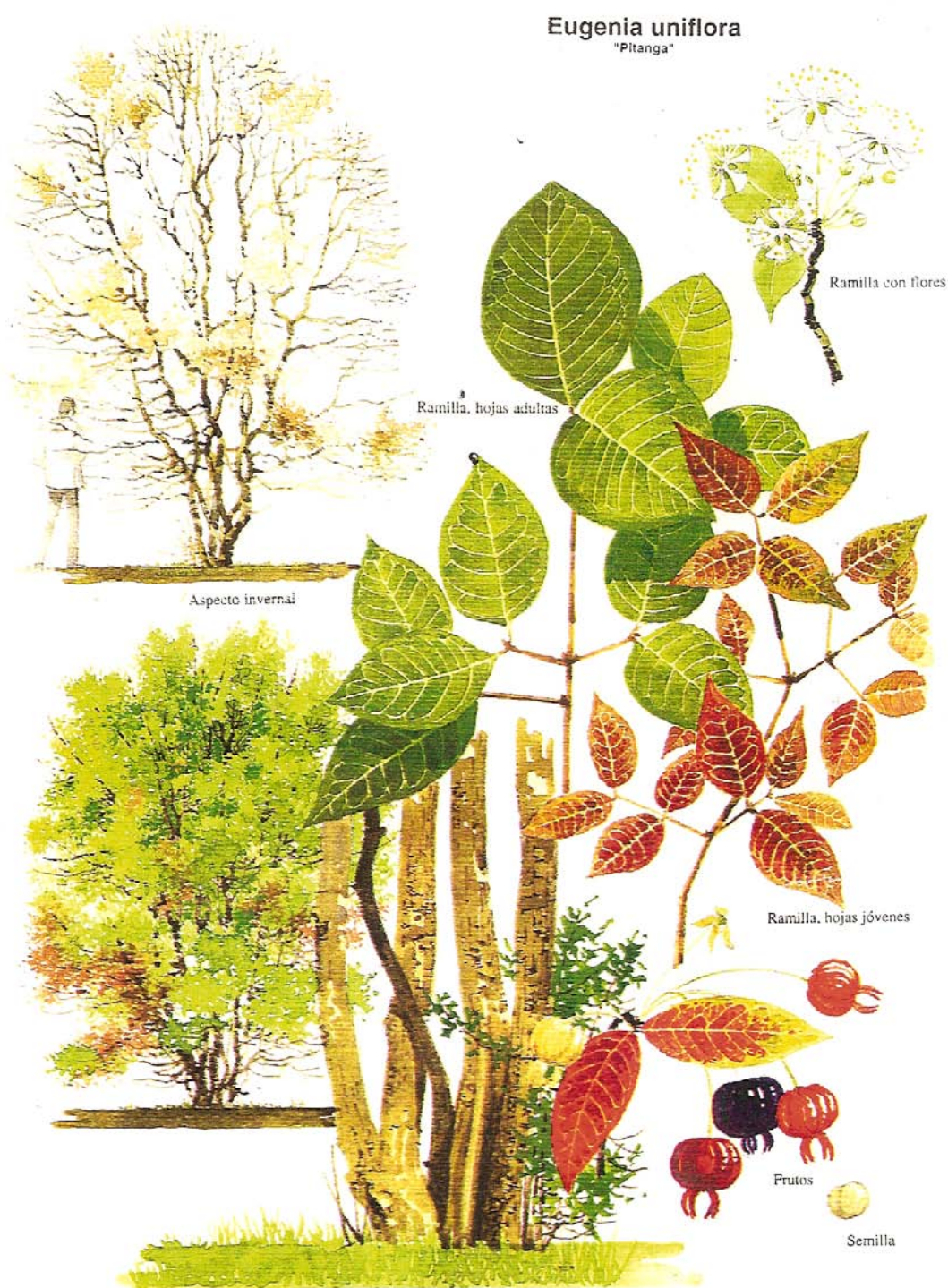
12. Resumen: extracción y fraccionamiento de *Eugenia uniflora*



Cuadro de metabolitos secundarios de *Eugenia uniflora*
Identificados en Fracción activa Fr. II A 9-15



13. PRESENTACIONES A CONGRESOS Y JORNADAS



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA - 144º JORNADAS CIENTÍFICAS

Eugenia uniflora L., su actividad anticonvulsivaBravi, V¹; del Valle, M.E.¹; Domínguez-Cabrera, M. J.²; Baldini, O.³; Bruno-Blanch, L.³

1-Tesistas del Magister en Plantas Medicinales. UNLP, 2-Pasante del Laboratorio Bago

3-Área Diseño de Fármacos, División Farmacia. UNLP

Introducción:

Eugenia uniflora L. (Mirtaceae) (*Stenocalyx micheli* (Lam.) O. Berg), llamada vulgarmente como "ñangapiri" o "pitanga", es un arbusto muy ramificado y globoso, con hojas opuestas, glabras, subsésiles, ovoido-lanceoladas, de 2,5-5 cm de largo. Sus flores son blancas-amarillentas, solitarias y axilares de 1,5-2 cm de diámetro. Su fruto es una baya roja de 2-3 cm de diámetro.

La medicina popular utiliza distintas especies de *Eugenia*, dado a que manifiestan actividades antidiarréicas (1), antiepilépticas (2), antibacterianas (3), hipotensoras (4) (5) e hipoglucemiantes (6) entre otras.

Nuestro interés se orienta a la evaluación de distintas acciones de *Eugenia uniflora* sobre el Sistema Nervioso Central (SNC). En esta comunicación presentamos su actividad anticonvulsiva.

Materiales y Métodos:

Las hojas de *Eugenia uniflora* L. fueron recolectadas en bosques secundarios en Santa Ana, Departamento Candelaria, Provincia de Misiones, Argentina. El código de la especie es N° A. G. Amat 2581 del herbario del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, Argentina. El material vegetal acondicionado fue sometido a extracciones con distintos solventes hasta agotarlo.

La evaluación de la actividad anticonvulsiva se hizo de acuerdo al Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program del National Institute of Health (NIH) (7) realizándose las fases 1 y 2. Se utilizaron ratones de 18-25 gr de peso (8), de 4 a 7 semanas de vida, mantenidos en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo (12 hs luz y 12 hs oscuridad) y con libre acceso a agua y alimento. La administración del extracto fue intraperitoneal. Se realizaron los test basados en la convulsión por electroshock (MES), convulsión inducida químicamente por pentilentetrazol (PTZ) subcutáneo y el test del rotorod para determinar neurotoxicidad.

Resultados:

A las dosis ensayadas según el Programa de Evaluación antes mencionado, el extracto no produce neurotoxicidad sobre los ratones, la cual se hubiera manifestado por ataxia. No se observó protección frente al MES test, pero si hubo protección frente al PTZ.

TEST	TIEMPO (hr)	DOSIS (*)		
		30 mg/Kg	100 mg/Kg	300 mg/Kg
MES	1/2	0/1	0/3	0/1
PTZ	1/2	0/1	0/1	1/1
Rotorod	1/2	0/2	0/4	0/2
MES	4	0/1	0/3	0/1
PTZ	4	0/1	0/1	1/1
Rotorod	4	0/2	0/4	0/2

* n° de animales protegidos / n° de animales testeados

Discusión:

El ácido gammaaminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el SNC, cuyo desbalance se encuentra asociado a varias enfermedades neurológicas, entre otras la epilepsia. Los resultados obtenidos, protección frente a PTZ, nos permitirían vincular que la posible acción anticonvulsiva del extracto hexánico ensayado está asociado al mecanismo de acción gabaérgico(9). Al momento de esta presentación se sigue el estudio de la fase 2 para determinar la dosis efectiva 50 (ED₅₀). De la misma manera se ha purificado el extracto hexánico, haciendo uso de Cromatografía Preparativa de Baja Presión (LPC), con el objeto de aislar el/los compuestos responsables de dicha actividad.

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA - 144ª JORNADAS CIENTÍFICAS

Agradecimientos:

Al Dr. A. Amat, por la muestra del vegetal. Al Laboratorio Bago. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 06-03237). Al colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires

Bibliografía:

- (1) Mukherjee, P K; Saha, K; Murugeson, T; Mandal, S C; Pal, M; Saha, B P. J. Ethnopharmacol. 60(1):85-9 (1998).
- (2) Pourgholami, M H; Kamalinejad, M; Javadi, M; Majzoub, S; Sayyah, M. J. Ethnopharmacol. 64(2): 167-71 (1999).
- (3) Agnihotri, S; Vaidya, A D. Indian J. Exp. Biol. 34(7): 712-5 (1996).
- (4) Schapoval, E E S; Silveira, S M; Miranda, M L; Alice, C B; Henriques A T. J. Ethnopharmacol. 44: 137-142 (1994).
- (5) Wazlawik, E; Da Silva, M A; Peters, R; Gomes Correia, J; Rocha Farías, M; Calixto, J; Do Valle, R. J. Pharmacol.. 49: 433-437 (1997).
- (6) Yasunori Momose. Comunicación Personal. Japón.
- (7) Swinyard, E.; Woodhead, J; White, S; Franklin, M. Antiepileptic Drugs, Third Edition, edited by R. Levy, R. Mattson, B. Meldrum, J. K. Penry, and F. E. Dreifuss. Raven Press, Ltd., New York 1989
- (8) Tantisira, B; Tantisira, M; Patarapanich, C; Sooksawate, T y Chunngam, T Research Communications in Molecular Pathology. 97(2):151-164 (1997).
- (9) Meza-Toledo, E; Martínez-Muñoz, D; Carvajal-Sandoval, G. Drug Res. 48 (II), nº 11 (1998).



Universidad Nacional de La Plata

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

PRIMERAS JORNADAS DE EDUCACION FARMACEUTICA EN EL NUEVO MILENIO

6, 7 Y 8 de Noviembre del 2001

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE:

.....
Del Valle, María E.¹, Domínguez Cabrera, J., Bruno Blanchi, L.
.....

**Han presentado el siguiente Trabajo a las Primeras Jornadas de Educación Farmacéutica
en el Nuevo Milenio: "El Farmacéutico Integrante del Equipo de Salud"**

.....
**ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA QUÍMICA DE PRINCIPIOS ACTIVOS PRESENTES EN Eugenia uniflora L.,
CROZANTO EN LOS COMPLEJOS SOCIALES EN METANOL**
.....

La Plata, Noviembre de 2001

Presidente Comité Organizador

Decano Facultad de Ciencias Exactas

XVI CONGRESO ITALO-LATINOAMERICANO DE ETNOMEDICINA

“Carlo L. Spegazzini”

La Plata, Argentina. 4 al 8 de Septiembre de 2007

IDENTIFICACION DE COMPUESTOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA DE *EUGENIA UNIFLORA* Del Valle, María; Sella, Mariana; Debenedetti, Silvia; Bruno Blanch, Luis. mariaelenadelvalle@hispavista.com *Cát. de Química Medicinal- Cát. de Farmacognosia. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP*

La epilepsia es un grupo heterogéneo de desórdenes neurológicos que afecta al 3% de la población mundial. El 30% de los pacientes epilépticos no consigue controlar sus convulsiones con las drogas antiepilépticas (AEDs) disponibles. Existe por lo tanto la necesidad de buscar nuevas AEDs que sean más eficaces y posean menor toxicidad, siendo los productos naturales una alternativa válida como fuente de nuevas estructuras. *Eugenia uniflora* L (Mirtaceae) es un arbusto ramificado y globoso, utilizado en la medicina tradicional en Brasil, Paraguay y NO de Argentina, sus nombres más comunes son “pitanga” y “ñangapirí”. Las hojas desecadas de *Eugenia uniflora* fueron secadas y molidas. 250 g del polvo fue extraído sucesivamente con hexano y metanol por maceración en frío y se preparó una infusión y un cocimiento (según FNA VI Ed.) del polvo del material vegetal al 5 % y 10% P/V, respectivamente. Los extractos hexánico, metanólico, la infusión y el cocimiento fueron evaluados de acuerdo al Anticonvulsant Drug Development (ADD). Los extractos fueron evaluados en su actividad anticonvulsiva, frente al MES test y PTZ test. El extracto metanólico fue fraccionado por distintas técnicas cromatográficas y las fracciones fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG- MS). El extracto metanólico demostró una actividad anticonvulsiva importante, como así también la fracción obtenida por precipitación que presentó una actividad anticonvulsiva 50% efectiva, dando hasta los 30 minutos 75 % efectividad, aumentando el umbral de las convulsiones clónicas inducidas por la administración de PTZsc. Se lograron identificar cuatro compuestos en la fracción activa de *Eugenia uniflora*. Nota: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y SECYT-UNLP X-377.

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES CON ACTIVIDAD ANTICONVULSIVA DE *EUGENIA UNIFLORA*

Del Valle, María; Sella, Mariana; Debenedetti, Silvia; Bruno Blanch, Luis.
Cát. de Química Medicinal- Cát. de Farmacognosia.
Facultad de Ciencias Exactas.UNLP.
mariaelenadelvalle@hispanavista.com



Eugenia uniflora L (Mirtaceae) es un arbusto ramificado y globoso, utilizado en la medicina tradicional en Brasil, Paraguay y NO de Argentina, sus nombres más comunes son "pitanga" y "ñangapirí"

EPILEPSIA

Afecta al 3% de la población mundial

Menor toxicidad

Buscamos drogas antiepilépticas más eficaces

➤ Nuevas estructuras

Origen: productos naturales

MATERIALES Y MÉTODOS

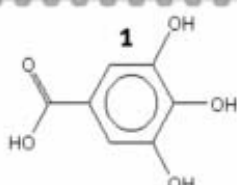
Material vegetal: Las hojas de *Eugenia uniflora* fueron recogidas en Posadas (Prov de Misiones, Argentina).

Preparación de los extractos: 250 g del material vegetal seco y molido fue extraído sucesivamente con hexano y metanol por maceración en frío. La infusión y el cocimiento fueron preparados según FNA VI Ed.

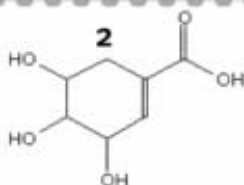
Método de evaluación de actividad anticonvulsivante: Los extractos fueron evaluados de acuerdo al Anticonvulsant Drug Development (ADD) en su actividad anticonvulsiva, frente al MES test y PTZ test.

Fraccionamiento del extracto activo: El extracto metanólico fue fraccionado por técnicas cromatográficas usuales y las fracciones fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG- MS).

CONCLUSIONES

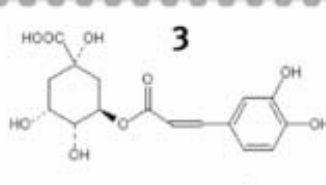


*El extracto metanólico de *Eugenia uniflora* mostró una actividad antiepiléptica importante, en la ED 50 = 160.4 mg/kg frente a PTZ eleva el umbral de crisis inducida por el shock eléctrico máximo, y puede compararse con la actividad antiepiléptica del Ácido Valproico. La fracción 9-15 presentó en una dosis de 200 mg/kg una actividad

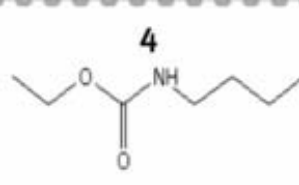


anticonvulsiva 50% efectiva a la hora, dando hasta los 30 minutos 75 % efectividad, aumentando el umbral de las convulsiones clónicas inducidas por la administración de PTZsc

*Se lograron identificar cuatro compuestos en la fracción activa, Ácido Gálico(1), Ácido Clorogénico (2), Ácido Shiquímico(3), y



un nuevo compuesto Ácido Carbámico, butil-etil, ester (4). Se están analizando para determinar los compuestos responsables de la actividad biológica. El compuesto (4) presenta similitud estructural con un nuevo antiepiléptico Retigabine (Rijn CM, Willems-van Bree E.2004) Se realizó un análisis de esta molécula mediante inteligencia



artificial, usando la química computacional que permite interpretar los resultados con un criterio predictivo, el cual se obtuvo una alta probabilidad de presentar protección frente a PTZ (lo que coincide con los resultados obtenidos con las muestras de *Eugenia uniflora*).